

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 2 年    1 月 2 9 日  
Date of Application:

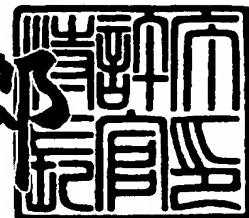
出 願 番 号                      特 願 2 0 0 2 - 0 2 0 0 8 3  
Application Number:  
[ST.10/C]:                      [ J P 2 0 0 2 - 0 2 0 0 8 3 ]

出      願                      人                      三 菱 化 学 株 式 有 限 公 司  
Applicant(s):

2 0 0 3 年    7 月 1 0 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号    出証特 2 0 0 3 - 3 0 5 6 1 6 4

【書類名】 特許願

【整理番号】 A21005A

【提出日】 平成14年 1月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N

【発明の名称】 細胞質雄性不稔から可稔への回復に関与するタンパク質  
及びそれをコードする遺伝子

【請求項の数】 22

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000番地 株式会社  
植物工学研究所内

【氏名】 今村 順

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000番地 株式会社  
植物工学研究所内

【氏名】 藤本 英也

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000番地 株式会社  
植物工学研究所内

【氏名】 今井 りつ子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000番地 株式会社  
植物工学研究所内

【氏名】 肥塚 信也

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000番地 株式会社  
植物工学研究所内

【氏名】 酒井 隆子

**【発明者】**

**【住所又は居所】** 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地 株式会社  
植物工学研究所内

**【氏名】** 早川 孝彦

**【特許出願人】**

**【識別番号】** 000005968

**【氏名又は名称】** 三菱化学株式会社

**【代理人】**

**【識別番号】** 100096219

**【弁理士】**

**【氏名又は名称】** 今村 正純

**【連絡先】** 03-3538-5680

**【選任した代理人】**

**【識別番号】** 100092635

**【弁理士】**

**【氏名又は名称】** 塩澤 寿夫

**【選任した代理人】**

**【識別番号】** 100095843

**【弁理士】**

**【氏名又は名称】** 釜田 淳爾

**【選任した代理人】**

**【識別番号】** 100104477

**【弁理士】**

**【氏名又は名称】** 藍原 誠

**【先の出願に基づく優先権主張】**

**【出願番号】** 特願2001-128008

**【出願日】** 平成13年 4月25日

**【先の出願に基づく優先権主張】****【出願番号】** 特願2001-202082**【出願日】** 平成13年 7月 3日**【手数料の表示】****【予納台帳番号】** 038357**【納付金額】** 21,000円**【提出物件の目録】****【物件名】** 明細書 1**【物件名】** 図面 1**【物件名】** 要約書 1**【プルーフの要否】** 要



【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞質雄性不稔から可稔への回復に関与するタンパク質及びそれをコードする遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Pentatricopeptide Repeat (以下PPRと略) モチーフを14個以上持ち、該PPRモチーフ群は3つ以上のブロックに分割されており、該各ブロックはそれぞれ少なくとも2つ以上のPPRモチーフを有し、かつ、カルボキシ末端(C末端)側のブロックは4つのPPRモチーフを有することを特徴とする細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

【請求項2】 PPRモチーフの数が14～16個であることを特徴とする請求項1に記載のタンパク質。

【請求項3】 PPRモチーフ群が3つのブロックに分割されており、アミノ末端(N末端)側から順に各ブロックが5個、7個及び4個のPPRモチーフを有することを特徴とする請求項1又は2に記載のタンパク質。

【請求項4】 アミノ末端(N末端)側から2番目のPPRモチーフに存在する4番目のアミノ酸がセリン、スレオニン又はシステイン以外であることを特徴とする請求項1～3に記載のタンパク質。

【請求項5】 アミノ末端(N末端)側から2番目のPPRモチーフに存在する4番目のアミノ酸がアスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸又はヒスチジンのいずれかであることを特徴とする請求項4のタンパク質。

【請求項6】 さらに、アミノ末端にミトコンドリアに移行するためのシグナルペプチド配列を有するか又はカルボキシ末端に-LysAspGluLeu-からなる配列を有することを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項7】 細胞質雄性不稔遺伝子の転写産物と接触させた後に該転写産物にゲルシフトを起こさせることを特徴とする細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

【請求項8】 下記の何れかのタンパク質。

(1) 配列番号3に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列を有するタンパク質;又は

(2) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列の 80～687 番目のアミノ酸配列において 1 から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

【請求項 9】 下記の何れかのタンパク質。

- (1) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は
- (2) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 1 から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

【請求項 10】 細胞質雄性不稔個体が、コセナダイコン及び／又はオグラダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子又はそのホモログを有するものであることを特徴とする請求項 1～9 に記載のタンパク質。

【請求項 11】 請求項 1～10 のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA。

【請求項 12】 下記の何れかの DNA。

- (1) 配列番号 2 に記載の塩基配列を有する DNA；又は
- (2) 配列番号 2 に記載の塩基配列において 1 から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA；又は
- (3) 配列番号 2 に記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA。

【請求項 13】 下記の何れかの DNA。

- (1) 配列番号 1 に記載の塩基配列の 3754 番目～8553 番目の塩基配列を有する DNA；又は
- (2) 配列番号 1 に記載の塩基配列の 3754 番目～8553 番目の塩基配列において 1 から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA；又は

(3) 配列番号 1 に記載の塩基配列の 3754 番目～8553 番目の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA。

【請求項 14】 下記の何れかの DNA。

(1) 配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA；又は

(2) 配列番号 1 に記載の塩基配列において 1 から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA；又は

(3) 配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA。

【請求項 15】 細胞質雄性不稔個体が、コセナダイコン及び／又はオグラダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子又はそのホモログを有するものである、請求項 11～14 の何れか 1 項に記載の DNA。

【請求項 16】 請求項 11～15 の何れかに記載の DNA を含有するベクター。

【請求項 17】 請求項 11～15 の何れかに記載の DNA 又は請求項 16 に記載のベクターを有する形質転換体。

【請求項 18】 形質転換植物である、請求項 17 に記載の形質転換体。

【請求項 19】 請求項 11～15 の何れかに記載の DNA を用いることを特徴とする、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復する方法。

【請求項 20】 細胞質雄性不稔遺伝子を有し、かつ、請求項 11～15 の何れかに記載の DNA を有する細胞に、さらに請求項 11～15 の何れかに記載の DNA の一部又は全部を誘導型プロモーターと共に導入することにより、雄性不稔回復遺伝子の発現を制御することが可能となった形質転換体。

【請求項 21】 請求項 20 に記載の形質転換体を利用することによる細胞質雄性不稔系統の維持方法。

【請求項 22】 請求項 11～15 の何れかに記載の DNA から任意に設定した 15～50mer のオリゴヌクレオチドプライマー、又は、請求項 11～15

の何れかに記載のDNAの全部又は1部からなる少なくとも15mer以上のプローブを使用し、目的の生物試料中に、該プライマーにより増幅される塩基配列の量、又は、プローブにより検出される塩基配列の量が、1ゲノム中に1遺伝子以上あることを確認することで、細胞質雄性不稔回復に関与する遺伝子を検出する方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

#### 【産業上の利用分野】

本発明は、細胞質雄性不稔から可稔への回復に関与する遺伝子に関する。より詳細には、本発明は、一代雑種（以下、F1と略す）品種開発のために利用される細胞質雄性不稔形質（以下、cmsと略すことがある）の回復に関与する遺伝子、当該遺伝子を含むベクター及び形質転換体に関するものである。

#### 【0002】

#### 【従来技術】

禾穀類、野菜などの農作物では、1) 雑種強勢による優れた農業形質、2) 収穫物の均一性、3) 次世代で遺伝形質が分離するため品種育成者の利益が保護される、などの特徴のもと、F1品種の開発が盛んであり、多くの主要作物で実用化されている。

#### 【0003】

F1品種の種子を生産するための方法の一つとしては、細胞質雄性不稔（cms）系統とその雄性不稔を回復する（以下、Rfと略すことがある）系統からなるcms/Rf採種システムがあり、例えばイネ、ソルガム、トウモロコシ等の禾穀類や例えばひまわりなどの油量作物で開発されているが、これらはいずれも、交配あるいは細胞融合の手法を用いて開発されたものである。

#### 【0004】

一方、アブラナ科では、自家不和合性を用いたF1採種システムが広く利用されているが、ナタネに関しては、安定な自家不和合性のないため、cms系統とRf系統を利用したF1採種システムが求められている。

#### 【0005】

これに対して、近年、コセナダイコン由来の細胞質雄性不稔（コセナ cms）やオグラダイコン由来の細胞質雄性不稔（オグラ cms）をナタネで利用する研究がなされている。両 cms 遺伝子に関しては細胞質小器官であるミトコンドリアのゲノムにコードされており、塩基配列についても知られているが、ダイコンは、分子生物学的な研究が進んでおらず、遺伝子単離に必要なマーカーもほとんど知られていない状態であるため、核からの遺伝子の単離が困難であり、Rf に関しては、ダイコンの稔性回復系統から交配あるいは細胞融合の手法を使いナタネに導入されているのみである。

#### 【0006】

さらに、Rf 遺伝子に関しては、植物の各 cms 系統により、1つ又は複数の回復遺伝子が存在する。ダイコンにおいては、Rf1 遺伝子及び Rf2 遺伝子が同時に存在することが稔性回復に必要であり、加えて、Rf1 遺伝子が、ダイコンの cms 原因タンパク質として知られている、ミトコンドリア内の ORF125 タンパク質 (M. Iwabuchi et al. Plant Mol. Biol. 39:183-188, 1999) の蓄積量を大幅に減少させることが知られている。(育種学雑誌 47 (別1) P186, 1997、育種学雑誌 48 (別1) P197、1998)。

#### 【0007】

またナタネにおいては、遺伝解析実験により、交配または細胞融合によって導入されたダイコンの Rf1 遺伝子が、cms 原因タンパク質として知られている ORF125 または ORF138 タンパク質 (M. Grelon et al. Mol. Gen. Genet. 243:540-547) の蓄積量を減少させること、これら ORF125 または ORF138 タンパク質の蓄積量の減少と稔性が回復する現象は完全に一致していることが知られている (N. Koizuka, et al. Theor Appl Genet, 100:949-955, 2000)。つまり、ナタネ雄性不稔系統で稔性が回復するには、ORF125 または ORF138 タンパク質の蓄積量の減少が必須であり、そのために、Rf1 遺伝子は重要な遺伝子である。

しかしながら、一方で Rf 遺伝子の塩基配列については、トウモロコシの cms の一つである T-サイトプラズムに対する回復遺伝子の一つである Rf2 遺伝子のみについては同定、単離されているが、他の植物で Rf 遺伝子の塩基配列に

については、全く知られていない。

#### 【0008】

##### 【発明が解決するための課題】

交配あるいは細胞融合によりオグラダイコン由来のR f 1 遺伝子を導入したナタネ回復系統とその系統を父親として作出されたF1品種は、グルコシノレート（以下G S Lと略す）含量が、規制値より高くなることがわかり、実用上問題となっている。これは、G S Lの生合成に参与するダイコン由来の遺伝子がR f 1 遺伝子の近傍に存在し、遺伝的に強連鎖しているため、ナタネの回復系統（R f 系統）のG S Lの含量が上昇するものと考えられている。G S Lはナタネの搾油かすに含まれ、それを飼料として動物に与えたとき、甲状腺肥大をもたらすことが知られているため、ナタネ種子のG S L含量は、育種段階において、北米では18 $\mu$ mole/g ヨーロッパでは20 $\mu$ mole/g以下にすることが求められている。

#### 【0009】

さらに、近年では、除草剤耐性等の機能を遺伝子組換えにより付加した植物の開発も活発であり、これらの植物を効率的に創出するためには、交配あるいは細胞融合により得られたナタネ回復系の存在のみでは不十分であり、R f 遺伝子、特には、ダイコン由来のR f 1 遺伝子の単離が望まれていた。

#### 【0010】

即ち、本発明は、R f 遺伝子、特には、ダイコン由来のR f 1 遺伝子を単離してその構造を同定することを解決すべき課題とした。さらに、本発明は、単離したR f 遺伝子を利用してナタネ回復系統を確立する手段を提供することを解決すべき課題とした。

#### 【0011】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、ダイコンからR f 1 遺伝子をクローニングすることに成功し、本課題を解決するに至った。

すなわち、本発明によれば、Pentatricopeptide Repeat（以下PPRと略）モチーフを14個以上持ち、該PPRモチーフ群は3つ以上のブロックに分割されており、該各ブロックはそれぞれ少なくとも2つ以上のPPRモチーフを有し、か

つ、カルボキシ末端（C末端）側のブロックは4つのPPRモチーフを有することを特徴とする細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質が提供される。

#### 【0012】

上記タンパク質の好ましい態様によれば、

PPRモチーフの数が14～16個であるタンパク質；

PPRモチーフ群が3つのブロックに分割されており、アミノ末端（N末端）側から順に各ブロックが5個、7個及び4個のPPRモチーフを有するタンパク質；

アミノ末端（N末端）側から2番目のPPRモチーフに存在する4番目のアミノ酸がセリン、スレオニン又はシステイン以外であるタンパク質；

アミノ末端（N末端）側から2番目のPPRモチーフに存在する4番目のアミノ酸がアスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸又はヒスチジンのいずれかであるタンパク質；並びに

さらに、アミノ末端にミトコンドリアに移行するためのシグナルペプチド配列を有するか又はカルボキシ末端に－LysAspGluLeu－からなる配列を有するタンパク質；

が提供される。

#### 【0013】

本発明の別の側面によれば、細胞質雄性不稔遺伝子の転写産物と接触させた後に該転写産物にゲルシフトを起こさせることを特徴とする細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかのタンパク質が提供される。

(1) 配列番号3に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は

(2) 配列番号3に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列において1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

## 【0014】

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかのタンパク質が提供される。

- (1) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は
- (2) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 1 から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

本発明において好ましくは、細胞質雄性不稔個体は、コセナダイコン及び／又はオグラダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子又はそのホモログを有するものである。

## 【0015】

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のいずれかのタンパク質をコードする DNA が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかの DNA が提供される。

- (1) 配列番号 2 に記載の塩基配列を有する DNA；又は
- (2) 配列番号 2 に記載の塩基配列において 1 から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA；又は
- (3) 配列番号 2 に記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA。

## 【0016】

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかの DNA が提供される。

- (1) 配列番号 1 に記載の塩基配列の 3754 番目～8553 番目の塩基配列を有する DNA；又は
- (2) 配列番号 1 に記載の塩基配列の 3754 番目～8553 番目の塩基配列において 1 から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA；又は
- (3) 配列番号 1 に記載の塩基配列の 3754 番目～8553 番目の塩基配列を



有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA。

#### 【0017】

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかのDNAが提供される。

(1) 配列番号1に記載の塩基配列を有するDNA；又は

(2) 配列番号1に記載の塩基配列において1から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA；又は

(3) 配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA。

本発明において好ましくは、細胞質雄性不稔個体は、コセナダイコン及び／又はオグラダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子又はそのホモログを有するものである。

#### 【0018】

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のDNAを含有するベクターが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のDNA又は本発明のベクターを有する形質転換体が提供される。形質転換体は、好ましくは形質転換植物である。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のDNAを用いることを特徴とする、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、細胞質雄性不稔遺伝子を有し、かつ、本発明のDNAを有する細胞に、さらに本発明のDNAの一部又は全部を誘導型プロモーターと共に導入することにより、雄性不稔回復遺伝子の発現を制御することが可能となった形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した形質転換体を利用することによる細胞質雄性不稔系統の維持方法が提供される。

#### 【0019】

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のDNAから任意に設定し

た15～50merのオリゴヌクレオチドプライマー、又は、上記した本発明のDNAの全部又は1部からなる少なくとも15mer以上のプローブを使用し、目的の生物試料中に、該プライマーにより増幅される塩基配列の量、又は、プローブにより検出される塩基配列の量が、1ゲノム中に1遺伝子以上あることを確認することで、細胞質雄性不稔回復に関与する遺伝子を検出する方法が提供される。

## 【0020】

### 【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

#### (1) 本発明のタンパク質の態様

本発明のタンパク質は下記(i)から(iv)のいずれかのタンパク質に関する。

(i) Pentatricopeptide Repeat (以下PPRと略) モチーフを14個以上持ち、該PPRモチーフ群は3つ以上のブロックに分割されており、該各ブロックはそれぞれ少なくとも2つ以上のPPRモチーフを有し、かつ、カルボキシ末端(C末端)側のブロックは4つのPPRモチーフを有することを特徴とする細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質；

(ii) 細胞質雄性不稔遺伝子の転写産物と接触させた後に該転写産物にゲルシフトを起こさせることを特徴とするタンパク質；

(iii) 下記の何れかのタンパク質。

(1) 配列番号3に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は

(2) 配列番号3に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列において1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質；並びに、

(iv) 下記の何れかのタンパク質。

(1) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は

(2) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個

体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

#### 【0021】

本明細書において、PPRモチーフとは「Pentatricopeptide Repeat」モチーフのことを称す。このPPRモチーフは、アラビドピシスのゲノムプロジェクトの進行によって見出された新しいタンパク質のモチーフ構造である。その基本モチーフは35個の縮重した (degenerate) したアミノ酸配列が、そのタンパク質の一次構造上でタンデムに繰り返されたものである。PPRモチーフは、コンセンサスアミノ酸配列として、アミノ末端 (N末端) - 「VTYNTLISGYCKNGKLEEALELFEEEMKEKGIKPDV」 - カルボキシ末端 (C末端) に代表される配列を有する。このモチーフは、Small and Peeters (文献 Trends Biochem Sci 2000, 25 46-47) によって提唱されたもので、アラビドピシスのゲノム中には、このモチーフを取りうる遺伝子が、この文献が出版された当時で200ほどGenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) などの遺伝子バンクに報告されている。現在、ある任意のタンパク質が、このモチーフ構造を持ち得るか否か判断は、英国のサンガー研究所内にあるProtein families database of alignments and HMMs (以下Pfamと略、<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>)にあるプログラムで容易に判断することができる。

#### 【0022】

現在までのところでPPRモチーフを有するタンパク質の機能が明らかになっている例としては、1) ミトコンドリアに移行するタンパク質である酵母のPET309やアカパンカビのCYA-5が、ミトコンドリア遺伝子であるcox1 mRNAと相互作用をしてcox1の発現を転写後のプロセッシングもしくは翻訳のレベルで制御している例 (Manthey and McEwen EMBO J 1995 14 4031-4043, Coffin et.al. Curr Genet 1997 32 273-280) や2) 葉緑体に移行するPPRモチーフタンパク質であるトウモロコシのCRP1が、葉緑体遺伝子であるpetAおよびpetD遺伝子の翻訳に必須であり、加えてpetDmRNAのプロセッシングのステップにも必須である例 (Fisk et.al. EMBO J 1999 18 2621-2630) 等が挙げられ、従って、PPRモチーフを有するタンパク質は、何らかの形で翻訳制御に関わっている可能性が高いと推察される。

#### 【0023】

今回、本発明者らがコセナダイコン細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する遺伝子を単離したところ、それによりコードされているタンパク質は、Pentatricopeptide Repeat (以下PPRと略) モチーフを14個以上持ち、加えて該PPRモチーフ群が3つ以上のブロックに分割されており、さらに該各ブロックはそれぞれ少なくとも2つ以上のPPRモチーフを有し、かつ、最もカルボキシ末端(C末端)側に存在するブロックは4つのPPRモチーフを有するものであることを見出した。

#### 【0024】

上述の細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質として好ましくは、PPRモチーフの数が14～16個のものであり、より好ましくはPPRモチーフ群が3つのブロックに分割されており、アミノ末端(N末端)側から順に各ブロックが5個、7個及び4個のPPRモチーフを有するものである。

具体的には、

- (1) PPRクラスター#1: N末端から1番目のPPRモチーフから5番目のPPRモチーフが連続した175残基からなるPPRクラスター、
  - (2) PPRクラスター#2: N末端から6番目のPPRモチーフから12番目のPPRモチーフが連続した245残基からなるPPRクラスター、
  - (3) PPRクラスター#3: N末端から13番目のPPRモチーフから16番目のPPRモチーフが連続した140残基、
- からなるものである。

#### 【0025】

更に好ましくはアミノ末端(N末端)側から2番目のPPRモチーフに存在する4番目のアミノ酸がセリン、スレオニン又はシステイン以外であるものであり、更に好ましくはアミノ末端(N末端)側から2番目のPPRモチーフに存在する4番目のアミノ酸がアスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸又はヒスチジンのいずれかであるものであり、特に好ましくはアミノ末端(N末端)側から2番目のPPRモチーフに存在する4番目のアミノ酸がアスパラギンであるものである。

## 【0026】

通常、稔性回復遺伝子は、核ゲノムに存在し、細胞質雄性不稔遺伝子はミトコンドリアに存在する事が知られているため、上記細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質は、さらに、アミノ末端にミトコンドリアに移行するためのシグナルペプチド配列を有するか又はカルボキシ末端に「LysAspGluLeu」からなる配列を有することが好ましい。

## 【0027】

該ミトコンドリアに移行するためのN末端のシグナルペプチドとしては、O. Emanuelsson ら(J. Mol. Biol. 300, 1005-1016(2000))のアルゴリズムを基にした予測プログラム「TargetP」(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)又は予測プログラム「Psort」(<http://psort.nibb.ac.jp/>)から確認されるものが挙げられ、また、該シグナルペプチドの具体例としては、シロイヌナズナAtOXA1遺伝子のシグナルペプチド(W. Sakamoto et al: Plant Cell Physiol, 41:1157-1163) (MetAlaPheArgGlnThrLeuSerIleArgSerArgLeuPheAlaArgArgAsnGlnProValTyrHisIleIleProArgGluSerAspHisGluArgAsp) といった配列が挙げられる。このうち、好ましくは配列番号3に記載のアミノ酸配列における1～79のアミノ酸配列が挙げられ、特に好ましくは、配列番号3に記載のアミノ酸配列における1～34のアミノ酸配列が挙げられる。

## 【0028】

また、本発明の細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質は、細胞質雄性不稔遺伝子の転写産物と結合することにより、その細胞質雄性不稔遺伝子の翻訳阻害を起こさせ、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復させるものである。

## 【0029】

細胞質雄性不稔遺伝子の転写産物としては、コセナ細胞質雄性不稔を引き起こす原因タンパク質であるORF125又はオグラ細胞質雄性不稔を引き起こす原因タンパク質であるORF138のそれぞれの遺伝子の転写産物(mRNA)が挙げられ、好ましくは該遺伝子の5'-UTR (Bonhomme et al; Mol Gen Genet, 235:340-348(1992))領域が挙げられる。

細胞質雄性不稔遺伝子の転写産物と結合するか否かを確認する方法としては、  
in vitroで人工的に転写させたorf125又はorf138のmRNAに本発明のタンパク  
質を加え、電気泳動させる方法、いわゆるゲルシフト法が挙げられ、具体的操作  
方法としては、ゲルシフト法として、通常行われているような条件で行えばよい  
。

#### 【0030】

また、ORF125又はORF138の遺伝子と、例えば $\beta$ -ガラクトシダー  
ゼヤルシフェラーゼのような検出可能なレポーター遺伝子との融合遺伝子が大腸  
菌などに発現させたものに、さらに本願タンパク質を加えることで発現が抑制さ  
れるか否かを確認する方法も挙げられる。

具体的には、配列番号2の塩基配列で示される稔性回復遺伝子が大腸菌発現ベ  
クターに組み込んだものと、orf125の5'-UTR領域と25アミノ酸のコーディング部  
分をLacZ遺伝子に融合したベクターを大腸菌に組み込み込んだものを作成し、誘導  
発現させると、稔性回復遺伝子を組み込んだ発現ベクターを同居させた場合にの  
み、LacZ遺伝子の発現が抑制されて、X-Galの存在下で青い大腸菌コロニーが白  
くなる。このように本願タンパク質をコードする遺伝子を利用し、上記のような  
確認を行うことによっても、細胞質雄性不稔遺伝子の翻訳阻害を起こさせること  
により、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復させる機能を有することが確  
認できる。

#### 【0031】

本発明の細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパ  
ク質の中で最も好ましいものとしては、

(1) 配列番号3に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列を有  
するタンパク質；又は(2) 配列番号3に記載のアミノ酸配列の80～687番  
目のアミノ酸配列において1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置  
換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回  
復することに関与するタンパク質が挙げられ、また、該配列にミトコンドリアへ  
の移行配列を有するものとしては、

(1) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は

(2) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 1 から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質が挙げられる。

#### 【0032】

本発明のタンパク質は、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与することができるタンパク質である。より具体的には、本発明のタンパク質をコードする DNA が導入されている形質転換植物 (R f 系統) を細胞質雄性不稔系統 (c m s 系統) の個体と交配させた場合に、稔性の回復された F1 種子を得ることができる。上記 c m s 系統の個体として好ましくは、コセナダイコン及び／又はオグラダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子が導入された個体が挙げられる。

本発明のタンパク質は、上述のようなゲルシフト法を利用してスクリーニングをし、単離したり、下記で説明する本発明の DNA を利用し、単離又は合成することができる。本発明のタンパク質の取得方法については後記する。

#### 【0033】

(2) 本発明の DNA の態様

本発明の DNA は、下記の (i) から (i v) の何れかの DNA に関する。

(i) 上記した本発明のタンパク質をコードする DNA。

(i i) 下記の何れかの DNA。

(1) 配列番号 2 に記載の塩基配列を有する DNA ; 又は

(2) 配列番号 2 に記載の塩基配列において 1 から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA ; 又は

(3) 配列番号 2 に記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA。

(i i i) 下記の何れかの DNA。

(1) 配列番号 1 に記載の塩基配列の 3 7 5 4 番目～8 5 5 3 番目の塩基配列を有する DNA ; 又は

(2) 配列番号 1 に記載の塩基配列の 3 7 5 4 番目～8 5 5 3 番目の塩基配列に

において 1 から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA ; 又は

(3) 配列番号 1 に記載の塩基配列の 3754 番目～8553 番目の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA。

(iv) 下記の何れかの DNA。

(1) 配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA ; 又は

(2) 配列番号 1 に記載の塩基配列において 1 から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA ; 又は

(3) 配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA。

#### 【0034】

本明細書では、本発明の DNA を、本発明の遺伝子と称する場合もある。

配列番号 1 で示される塩基配列は、8553 個の塩基から成るゲノム DNA 塩基配列であり、配列番号 2 で示される塩基配列は、配列番号 1 より得られたコード配列である。配列番号 3 は、配列番号 2 で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列である。

#### 【0035】

本明細書において「1 から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列」とは、例えば 1～20 個、好ましくは 1～15 個、より好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個の任意の数の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列のことを言う。

本明細書において、「1 から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列」とは、例えば 1～20 個、好ましくは 1～15 個、より好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個の任意の数のアミノ酸が欠失、付加または置換されているアミノ酸配列のことを言う。



## 【0036】

本明細書において「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、DNAをプローブとして使用し、コロニーハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAの塩基配列を意味し、例えば、コロニーあるいはプラーク由来のDNAまたは該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2×SSC溶液（1×SSCの組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNA等を挙げることができる。

## 【0037】

ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989. 以後”モレキュラークローニング第2版”と略す）等に記載されている方法に準じて行うことができる。

## 【0038】

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、プローブとして使用するDNAの塩基配列と一定以上の相同性を有するDNAが挙げられる。ここで言う一定以上の相同性とは、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは93%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは97%以上である。なお、ここで言う一定以上の相同性を有するDNAとしては、上記した相同性を有するポリヌクレオチドおよびその相補鎖ポリヌクレオチドの両方を包含する。

## 【0039】

本発明のDNAは、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与することができるDNAである。より具体的には、本発明のDNAを導入した形質転換植物（Rf系統）を細胞質雄性不稔系統（cms系統）の個体と交配させることにより、稔性の回復されたF1種子を得ることができる。上記cms系統の個体として好ましくは、コセナダイコン及び／又はオグラダイコンの細胞質雄

性不稔遺伝子が導入された個体が挙げられる。

#### 【0040】

##### (3) 本発明のDNAの取得方法

本発明のDNAの取得方法は特に限定されない。本明細書中に開示した配列番号1または配列番号2に記載の塩基配列、並びに配列番号3に記載したアミノ酸配列または配列番号3に記載したアミノ酸配列の情報に基づいて得られたPPRモチーフやミトコンドリア移行配列を組み合わせ得られるアミノ酸配列の情報に基づいて、当業者に公知の一般的育種手法及び一般的遺伝子工学的手法を利用することにより、本発明のDNAを単離又は合成することができる。

#### 【0041】

具体的には、本発明の遺伝子が発現される適当な植物起源、具体的にはダイコンの品種や近縁種を含む *Raphanus* 属の植物又は交配や細胞融合の手法によりこれらの植物から細胞質雄性不稔回復遺伝子を含んだゲノムDNAが移入されたその他の植物、より具体的にはコセナダイコン、オグラダイコン、園紅ダイコン又はこれらのダイコンの品種や近縁種等の *Raphanus* 属の植物又は交配や細胞融合の手法によりこれらの植物の細胞質雄性不稔回復遺伝子を含んだゲノムDNAが移入されたブラシカ属の植物から得ることができ、例えば、Rf 遺伝子の近傍に位置するDNAマーカーを単離し、このDNAマーカーとRf 遺伝子の遺伝距離の関係を示したゲノムの地図を作製し、ゲノムの地図を出発点としてRf 領域のポジショナルクローニング法（クロモゾームウォーキングとも言う）によって、本発明の遺伝子を単離、取得できる。

#### 【0042】

この手法はゲノムDNA上に適当なDNAマーカーを見だし、Rf 遺伝子とDNAマーカーの遺伝距離を測ることでゲノムの地図を作製することから始める。DNAマーカーは父親由来のゲノムと母親由来のゲノムとを識別する必要がある、一般的には数100bpの長さからなる。またDNAマーカーは遺伝子と同一染色体上に座乗している必要がある、遺伝子との距離が近いために遺伝様式がほぼ同様となるようなもの、つまり遺伝的に強く連鎖しているマーカーほど望ましい。

## 【0043】

DNAマーカー単離法には、以前よりRFLP法が使われていたが、近年はPCRを用いた簡便な方法であるRAPD法やAFLP (Amplified fragment length polymorphism) 法 (Nucleic Acids Research, 1995, Vol.23, No.21, 4407-4414) が利用されている。特に、AFLP法は遺伝的に強く連鎖するマーカーを得る手段として有効である。マーカーとの遺伝距離を測る材料として、通常、Rf1遺伝子を持たない劣性ホモ個体とRf1遺伝子をホモに有する優性ホモ個体を交配したF1世代を自家受粉して得られるF2集団やF1世代とこの親である目的の遺伝子を持たない劣性ホモ個体を交配して得られるBC1集団を用いることができる。

## 【0044】

上記劣性ホモ個体としては、細胞質雄性不稔系統のダイコンの品種、近縁種を含むRaphanus属植物、より具体的には細胞質雄性不稔系統のコセナダイコンやオグラダイコン、又は、コセナダイコン由来の細胞質雄性不稔 (コセナcms) やオグラダイコン由来の細胞質雄性不稔 (オグラcms) が移入されたブラシカ属植物、より具体的にはcmsナタネを使用することができる。

## 【0045】

上記優性ホモ個体としては、Rf系統であるダイコンの品種、近縁種を含むRaphanus属の植物、より具体的には細胞質雄性不稔回復系統のコセナダイコン、オグラダイコン、園紅ダイコン、又は、これらのダイコンの品種や近縁種を含むRaphanus属植物の細胞質雄性不稔回復遺伝子を含んだゲノムDNAが交配や細胞融合の手法により移入されたブラシカ属の植物、より具体的にはRfナタネを使用することができる。

## 【0046】

これらの両親を交配して得られたF1世代を自家受粉して得られるF2集団や、F1世代と劣性ホモ個体を交配して得られるBC1集団は、通常は100個体以上、より好ましくは1000個体以上解析することが望ましく、個体数が増すほどゲノムの地図の精度が上がり、DNAマーカーから目的の遺伝子までの物理的距離が短くなる。Rf遺伝子の場合も同様に、より物理的距離が短いDNAマ

ーカーを得ることが可能になる。

#### 【0047】

DNAマーカーとRf遺伝子の遺伝距離を測る材料としては、例えば、cms系統コセナダイコン(*Raphanus sativus* cv. Kosen)とRf系統である園紅ダイコン(*Raphanus sativus* cv. Yuanhong)とをN. Koizuka, et al. Theor Appl Genet, 100:949-955, 2000に記載の方法に準じ、交配したダイコンF1世代を自家受粉して得られる数千個のF2集団を用いることができる。これらを解析することにより、Rf遺伝子を挟むような形で、両側にそれぞれ0.2cM程度の遺伝距離で離れた位置に連鎖するDNAマーカーを単離することができ、これにより図1に示すようなマーカーとRf遺伝子の遺伝距離を示したゲノムの地図を作成することができる。

#### 【0048】

ゲノムの地図作成に続いては、その位置に対応するゲノムDNAをクローン化し、目的の遺伝子を挟むDNAマーカー間を繋ぐことが必要になる。通常はDNAマーカーと目的遺伝子との物理距離が離れているため、ゲノムDNA断片を持つクローンを複数個繋げることによって、DNAマーカーから目的遺伝子領域をカバーすることになる。このDNAマーカー間を、ゲノムDNA断片を持つクローンで繋ぐ行程がコンティグの作製である。Rf遺伝子の場合も同様に、よりRf遺伝子に近い位置に存在するDNAマーカー間を、Rf遺伝子領域をカバーするように、ゲノムDNA断片を持つクローンを複数個繋ぐことによってコンティグを作製することができる。

#### 【0049】

ゲノムDNA断片をもつクローンの集合体はゲノミックライブラリーを作製することで得られる。通常は、クローニングできるゲノムDNAの長さによって、いくつかの種類のベクターが使用され、例えば、約20kbまでの断片をクローニングできるラムダファージベクター、比較的長い断片(～40kb)がクローニングできるコスミドベクター、より長い1.00kb以上の断片をクローニングできるBAC (Bacterial artificial chromosome) ベクター等を利用したライブラリーが挙げられる。

## 【0050】

いずれのライブラリーも、クローニングされた断片の平均長にライブラリーの集団数を乗じた値が、ライブラリーに供与されたゲノムの全長（ゲノムサイズ）に対して4から5倍程度の値に成ることが重要である。ダイコンのゲノムサイズは約500Mbpと考えられているので、ラムダファージベクターで平均長20kbの場合、集団数は $1.0 \times 10^5$ 個から $1.25 \times 10^5$ 個となり、コスミドライブラリーで平均長が40kbの場合は、集団数は $5.0 \times 10^4$ 個から $6.25 \times 10^4$ 個となる。ナタネのゲノムサイズは約1000Mbpと考えられているので、ラムダファージベクターで平均長20kbの場合、集団数は $2.0 \times 10^5$ 個から $2.5 \times 10^5$ 個となり、コスミドライブラリーで平均長が40kbの場合は、集団数は $1.0 \times 10^5$ 個から $1.25 \times 10^5$ 個となる。

## 【0051】

ライブラリーに供与するゲノムDNAは、目的の遺伝子を含む生物からゲノムDNAを常法により抽出すればよい。Rf遺伝子の場合、Rf系統であるダイコンの品種、近縁種を含むRaphanus属の植物、より具体的には細胞質雄性不稔回復系統のコセナダイコン、オグラダイコン、園紅ダイコン、又は、これらのダイコンの品種や近縁種を含むRaphanus属植物の細胞質雄性不稔回復遺伝子を含んだゲノムDNAが交配や細胞融合の手法により移入されたブラシカ属の植物、より具体的にはRfナタネが利用できる。一般的には、F2集団やBC1集団を作製した時に利用した親と同じRf系統の植物からゲノムDNAを抽出し、ゲノミックライブラリーを作製することが最も望ましいと考えられる。ゲノムDNAはCTAB法（Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980) Nucleic Acids Res., 8, 4321）のような常法に従い、調製することができる。

## 【0052】

コンティグの作製は最初に、Rf遺伝子の両側に位置するDNAマーカーを保持するクローンを単離する。ゲノミックライブラリーから、常法により、ラムダファージライブラリーの場合は、プラークハイブリダイゼーション法を用いて、コスミドライブラリーとBACライブラリーの場合はコロニーハイブリダイゼーション法を用いて単離する。次にその単離したクローンの末端領域を指標にして

、そのクローンに隣接するクローンを単離する事によってコンティグを作製する。作成後、コンティグの塩基配列を、常法により決定する。

#### 【0053】

近年のゲノムプロジェクトの進展から、ゲノムDNAの塩基配列から機能する遺伝子を推定する技術が発達してきた。「Genscan」に代表される遺伝子発見プログラムは、かなりの確度で遺伝子を推定することができる。また「BLAST」に代表されるホモロジー検索プログラムは、他の遺伝子やタンパク質の類似性を推定することができる。このような解析ソフトウェアを利用して、目的の遺伝子を推定し、単離することが行われている。Rf遺伝子の場合も、同様にコンティグのゲノムDNA配列を同様の解析ソフトウェアを利用して、単離、同定することが可能である。また解析すると、ゲノムDNA塩基配列上のプロモーター部分、イントロンを含んだ構造遺伝子部分、ターミネーター部分が明示される。また同時に、イントロンを含んだ構造遺伝子に対して、イントロンが除かれたタンパク質に翻訳される形の遺伝子とその遺伝子に対するアミノ酸配列が明示される。この様にしてコンティグ上のRf遺伝子をかなりの確度で推定することが可能である。

#### 【0054】

また、上記解析ソフトを利用し推定された遺伝子配列を元にして、生体内で目的のゲノムが実際にはどのような形で発現しているかどうかを確認するために、mRNAを精製し、これに対する相補DNA(cDNA)を単離することで証明できる。また、どこから転写が開始しているかについては簡便法としては5'-RACE法と呼ばれるPCRを応用した方法やより確実にはプライマーイクステンション法やS1マッピング法をもちいて解析することで証明することが可能である。

以上の方法は、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989. 等に記載されている。

#### 【0055】

上述の手法で推定される塩基配列を元にして、単離された本発明の遺伝子としては、具体的には、配列番号2で示されるDNAが挙げられ、これにより、該D

N A 配列をもとに、一般的な遺伝子工学的手法によって、他の植物起源等から c D N A を容易に単離することも可能となった。

#### 【0056】

具体的には、本発明の遺伝子が発現される適当な植物起源、具体的にはダイコンの品種や近縁種を含む *R a p h a n u s* 属の植物又は交配や細胞融合の手法によりこれらの植物から細胞質雄性不稔回復遺伝子を含んだゲノム D N A が移入されたその他の植物、より具体的にはコセナダイコン、オグラダイコン、園紅ダイコン又はこれらのダイコンの品種や近縁種等の *R a p h a n u s* 属の植物又は交配や細胞融合の手法によりこれらの植物の細胞質雄性不稔回復遺伝子を含んだゲノム D N A が移入されたブラシカ属の植物から、常法に従って c D N A ライブラリーを調製し、該ライブラリーから、本発明の遺伝子に特有の適当な D N A 断片をプローブとして、又は本発明の遺伝子の翻訳産物に対する抗体を用いて所望のクローンを選抜することにより、本発明の遺伝子に相当する c D N A を単離することができる。

#### 【0057】

上記において、c D N A の起源としては、本発明の遺伝子を発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養細胞が例示される。また、これらからの全 R N A の分離、m R N A の分離や精製、c D N A の取得とそのクローニングなどはいずれも常法に従って実施することができる。

本発明の遺伝子を c D N A ライブラリーからスクリーニングする方法も、特に制限されず、通常の方法に従うことができる。

#### 【0058】

ここで用いられるプローブとしては、本発明の遺伝子の塩基配列に関する情報をもとにして化学合成された D N A などが一般的に使用できるが、すでに取得された本発明の遺伝子やその断片も良好に使用できる。また、本発明の遺伝子の塩基配列情報に基づき設定したセンスプライマー、アンチセンスプライマーをスクリーニング用プローブとして用いることもできる。

#### 【0059】

前記プローブとして用いられるセンスプライマーとアンチセンスプライマーの

ヌクレオチド配列は、配列番号 3 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA に対応する部分ヌクレオチド配列であって、少なくとも 15 個～50 の連続した塩基、好ましくは 20～30 個の連続した塩基を有するものが挙げられる。あるいは前記配列を有する陽性クローンそれ自体をプローブとして用いることもできる。

#### 【0060】

本発明の遺伝子の取得に際しては、PCR 法による DNA/RNA 増幅法や 5'-RACE 法等に代表される RACE 法等、遺伝子の単離に通常用いられる手法を組み合わせて行えばよい。

#### 【0061】

かかる PCR 法の採用に際して使用されるプライマーは、本発明によって明らかにされた本発明の遺伝子の配列情報に基づいて適時設定でき、これは常法に従って合成できる。なお、増幅させた DNA/RNA 断片の単離精製は、前記の通り常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法などで行うことができる。

#### 【0062】

また、上記で得られる本発明の遺伝子あるいは各種 DNA 断片は、常法に従って、その塩基配列を決定することができる。

このようにして得られる本発明の遺伝子によれば、例えば該遺伝子の一部または全部の塩基配列を利用することにより、個体もしくは各種組織における本発明遺伝子の存在と発現の有無を特徴的に検出することができる。

#### 【0063】

前述した通り、本発明の遺伝子としては、例えば配列番号 3 に示されるアミノ酸配列をコードする DNA を挙げることができるが、特にこれに限定されることなく、当該遺伝子の相同物も包含される。

ここで遺伝子の相同物とは、本発明遺伝子（またはその遺伝子産物）と配列相同性を有し、上記構造的特徴、および上記したようなその生物学的機能の類似性により一つの遺伝子ファミリーと認識される一連の関連遺伝子を意味し、該遺伝子の対立遺伝子も当然含まれる。

#### 【0064】



例えば、本発明の遺伝子は、配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示される特定の塩基配列を有する遺伝子に限らず、配列番号 3 で示した各アミノ酸残基に対する任意のコドンを組み合わせて選択した塩基配列を有することも可能である。コドンの選択は、常法に従うことができ、例えば利用する宿主のコドン使用頻度などを考慮することができる。

#### 【0065】

また、前記の通り、本発明の遺伝子は、配列番号 1 又は配列番号 2 又はそれらの一部に示される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA をも包含する。このような DNA は、配列番号 1 又は配列番号 2 又はその一部に示される塩基配列を有する DNA と一定以上の相同性を有する DNA である。

#### 【0066】

上記した一定以上の相同性を有する DNA とは、配列番号 1 又は 2 で示される塩基配列又はそれらの一部あるいは配列番号 3 で示されるアミノ酸配列又はその一部をコードする塩基配列と少なくとも 70% の同一性、好ましくは少なくとも 90% の同一性、より好ましくは少なくとも 95%、さらにもっとも好ましくは少なくとも 97% の同一性を有するポリヌクレオチドおよびその相補鎖ポリヌクレオチドを言う。

#### 【0067】

より具体的には、例えば、0.1% SDS を含む 0.2×SSC 中 50℃ または 0.1% SDS を含む 1×SSC 中 60℃ のストリンジェントな条件下で、配列番号 1 又は配列番号 2 に示される塩基配列又はそれらの一部の塩基配列を有する DNA とハイブリダイズする塩基配列を有する DNA を例示することができる。

#### 【0068】

また、本発明の DNA のうち、特に、

配列番号 1 に記載の塩基配列又はその一部において 1 から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA；

配列番号 2 に記載の塩基配列又はその一部において 1 から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA ; 及び

配列番号 3 に記載のアミノ酸配列又はその一部において 1 から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質をコードする DNA

については、化学合成、遺伝子工学的手法、突然変異誘発などの当業者に既知の任意の方法で作製することができる。例えば、配列番号 1 又は 2 に記載の塩基配列またはそれらの一部の塩基配列を有する DNA を利用し、これら DNA に変異を導入することにより変異遺伝子を取得することができる。

#### 【0069】

変異遺伝子を得るための方法として、例えばランダム突然変異体、標的のある突然変異体、合成遺伝子を用いた方法など（新遺伝子工学ハンドブック、実験医学 別冊、羊土社、1996 参照）等の公知の方法を用いることができる。

具体的には、配列番号 1 又は 2 の塩基配列又はそれらの一部の塩基配列を有する DNA に対し、変異原となる薬剤と接触作用させる方法、紫外線を照射する方法、遺伝子工学的手法等を用いて行うことができる。遺伝子工学的手法の一つである部位特異的変異誘発法は特定の位置に特定の変異を導入できる手法であることから有用であり、モレキュラークローニング第 2 版等に記載の方法に準じて行うことができる。

#### 【0070】

##### (4) 本発明の DNA を含有するベクター

本発明の DNA は適当なベクター中に組み込んで組み換えベクターとして使用することができる。ベクターの種類は発現ベクターでも非発現ベクターでもよく、目的に応じて選ぶことができる。

クローニングベクターとしては、大腸菌 K12 株中で自律複製できるものが好ましく、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる、大腸菌の発現用ベクターをクローニングベクターとして用いてもよい。具体的には、ZA

P Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript I SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494(1989)]、Lambda ZAP II(ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49(1985)]、λTriplEx(クローンテック社製)、λExCell(ファルマシア社製)、pT7T318U(ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pMW218(和光純薬社製)、pUC118(宝酒造社製)、pEG400 [J. Bac., 172, 2392 (1990)]、pQE-30 (QIAGEN社製)等をあげることができる。

#### 【0071】

発現ベクターは宿主との組み合わせを考えて選択することができ、好ましくは宿主細胞において自立複製可能なものは染色体中への組込みが可能で、本発明の遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌を宿主細胞として用いる場合は、DNAを発現させるための発現ベクターは該細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、上記DNAおよび転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

#### 【0072】

細菌用の発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2(いずれもベーリンガーマンハイム社より市販)、pKK233-2(Pharmacia社製)、pSE280(Invitrogen社製)、pGEMEX-1(Promega社製)、pQE-8(QIAGEN社製)、pQE-30(QIAGEN社製)、pKYP10(特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669(1984)]、PLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277(1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 4306 (1985)]、pBluescriptII SK+、pBluescriptII SK(-)(Stratagene社製)、pTrs30(FERMBP-5407)、pTrs32(FERM BP-5408)、pGEX(Pharmacia社製)、pET-3(Novagen社製)、pTerm2(US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB10、pTP5、pC194、pUC18 [Gene, 33, 103(1985)]、pUC19 [Gene, 33, 103(1985)]、pSTV28(宝酒造社製)、pSTV29(宝酒造社製)、pUC118(宝酒造社製)、pPA1(特開昭63-233798)、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392(1990)]、pQE-30(QIAGEN社製)等を例示することができる。細菌用のプロモーターとしては、例えば、trpプロモーター(P trp)、lacプロモーター(P lac)、PLプロモーター、PRプロモ-

ター、PSEプロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等を挙げることができる。

。

#### 【0073】

酵母用の発現ベクターとして、例えば、YEp13(ATCC37115)、YEp24(ATCC37051)、Ycp50(ATCC37419)、pHS19、pHS15等を例示することができる。酵母用のプロモーターとしては、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターを挙げることができる。

#### 【0074】

動物細胞用の発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8(フナコシ社より市販)、pAGE107〔特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)〕、pAS3-3(特開平2-227075)、pCDM8〔Nature, 329, 840, (1987)〕、pcDNA1/AmP(Invitrogen社製)、pREP4(Invitrogen社製)、pAGE103〔J.Biochem., 101, 1307(1987)〕、pAGE210等を例示することができる。動物細胞用のプロモーターとしては、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等を挙げることができる。

#### 【0075】

植物細胞用の発現ベクターとしては、例えば、pIG121-Hm〔Plant Cell Report, 15, 809-814(1995)〕、pBI121〔EMBO J. 6, 3901-3907(1987)〕、pLAN411やpLAN421〔Plant Cell Reports 10(1991) 286-290〕を例示することができる。また、特に10kb以上の長いDNA断片を植物に導入するときは、長鎖DNAを安定的に保持・導入できるように改良されたベクターの使用が望ましい。例えば、pBIBAC2(Gene 200(1997)107-116)、pYLAC7〔PNAS 96(1999)6535-6540〕やpBGRZ2〔バイオサイエンスとインダストリー55(1997)37-39〕があげられる。

植物細胞用のプロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルス

35Sプロモーター [Mol.Gen.Genet (1990) 220, 389-392] 等が挙げられる。

なお、植物の形質転換についての詳細は別途後述する。

#### 【0076】

(5) 本発明のDNAを有する形質転換体

本発明のDNAを有する形質転換体は、上記した組み換えベクター（好ましくは発現ベクター）を宿主に導入することにより作製することができる。

細菌の宿主細胞の具体例としては、Escherichia属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Bacillus属、Microbacterium属、Serratia属、Pseudomonas属、Agrobacterium属、Alicyclobacillus属、Anabaena属、Anacystis属、Arthrobacter属、Azobacter属、Chromatium属、Erwinia属、Methylobacterium属、Phormidium属、Rhodobacter属、Rhodopseudomonas属、Rhodospirillum属、Scenedesmus属、Streptomyces属、Synnecoccus属、Zymomonas属等に属する微生物をあげることができる。細菌宿主へ組換えベクターを導入する方法としては、例えば、カルシウムイオンを用いる方法やプロトプラスト法等を挙げることができる。

#### 【0077】

酵母宿主の具体例としては、サッカロミセス・セレビシェ (Saccharomyces cerevisiae)、シズサッカロミセス・ボンベ (Schizosaccharomyces pombe)、クリュイベロミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis)、トリコスポロン・プルランス (Trichosporon pullulans)、シュワニオミセス・アルビウス (Schwanniomyces alluvius) 等を挙げることができる。

酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロボラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

#### 【0078】

動物細胞宿主としては、ナマルバ細胞、COS1細胞、COS7細胞、CHO細胞等を挙げることができる。

動物細胞への組み換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入できるいかなる方法も用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

植物細胞を用いた形質転換体については後述する。

#### 【0079】

##### (6) 本発明のタンパク質の取得方法

本発明のタンパク質の取得方法は特に限定されない。本明細書中に開示した配列番号3に記載したアミノ酸配列又は配列番号3に記載したアミノ酸配列の情報に基づいて得られるPPRモチーフやミトコンドリア移行配列を、組み合わせて得られるアミノ酸配列の情報に基づいて、当業者に一般的遺伝子工学的手法を利用することにより、本発明のタンパク質を単離、発現、又は合成することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNAを単離または合成して、細胞に導入することにより発現させることができる。

本発明のタンパク質は、例えば、本発明の遺伝子を有する形質転換体を培養し、培養物中に本発明のタンパク質を生成蓄積させ、該培養物より該タンパク質を採取することにより取得することができる。

#### 【0080】

本発明の遺伝子を有する形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

本発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行うことが好ましく、培養温度は通常15～40℃であり、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

#### 【0081】

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPM11640培地〔The Journal of the American Medical Associ

ation, 199, 519(1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501(1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396(1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常 pH 6～8、30～40℃、5%CO<sub>2</sub> 存在下等の条件下で1～7日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

#### 【0082】

植物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、MS培地、R2P培地等、その植物種に応じて通常用いられる培地が用いられる。培養は、通常 pH 6～8、15～35℃等の条件下で1～21日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

#### 【0083】

形質転換体の培養物から、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する本発明のタンパク質を単離精製するには、通常のタンパク質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明のタンパク質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常のタンパク質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース、DIAION HPA-75(三菱化学社製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

## 【0084】

また、該タンパク質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該タンパク質を回収後、該タンパク質の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該タンパク質を正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

## 【0085】

本発明のタンパク質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該タンパク質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

## 【0086】

また、本発明のタンパク質は、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、桑和貿易(米国Advanced Chem Tech社製)、パーキンエルマージャパン(米国Perkin Elmer社製)、アマシャムファルマシアバイオテク(Amersham Pharmacia Biotech社製)、アロカ(米国Protein Technology Instrument社製)、クラボウ(米国Synthecell-Vega社製)、日本パーセプティブ・リミテッド(米国PerSeptive社製)、島津製作所等のペプチド合成機を利用し合成することもできる。

## 【0087】

(7) 本発明のDNAを有する植物の形質転換体

配列番号1に記載された塩基配列は、植物ゲノム本来の塩基配列を抜き出した形の塩基配列である。この塩基配列は、遺伝子の発現に必要なプロモーターとターミネーターを作用可能な形で含んでいる。導入するベクターは、直接導入法の場合は一般的なクローニングベクター、たとえばコスミドpWE15 (STRATAGENE社



製)などに当該遺伝子をクローニングすることができる。アグロバクテリウムを利用する場合は、一般的な植物形質転換用ベクター、たとえばpBI121 (Clontec社製)などにクローニングすることができる。

#### 【0088】

また、この配列(ゲノム配列)から一部のイントロンを抜き出した塩基配列のDNAや、ほとんどすべてのイントロンを抜き出した塩基配列のDNA、配列番号2で示されるDNA又はその238~2064番目の塩基に該当する部分、配列番号3又はその80~687残基に該当する部分で示されるタンパク質をコードするDNA植物細胞に導入してもよい。

#### 【0089】

さらに、プロモーターとターミネーター部分を既知の植物細胞中で機能するプロモーターやターミネーターと置換してもよい。

尚、上記配列番号2又はその238~2064番目の塩基で示されるDNAや配列番号3又はその80~687残基に該当する部分で示されるタンパク質をコードするDNAを植物細胞に導入する場合には、このDNAの他にプロモーターとターミネーターが必要である。通常よく使用される一般的な発現ベクターとしては、pBI121(clonetec社製)が挙げられるが、このベクターはプロモーターにカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター、ターミネーターに*A. tumefaciens*のTiプラスミドに存在するノパリン合成酵素のターミネーターが使用されている。また発現に必要なプロモーターとしては、上記カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターに限らずに、植物に広く存在するrbcsプロモーター等を用いてもよく、より好ましくは花粉の生育期に発現する種類のプロモーター例えばTA29プロモーターが、さらに好ましくは当該遺伝子上流に配位された本来のプロモーターが用いられる。ターミネーターについても、上記ノパリン合成酵素のターミネーターに限らず、カリフラワーモザイクウイルスの35Sターミネーター等を用いることができ、より好ましくは当該遺伝子下流に配位された本来のターミネーターが用いられる。

加えて、上記配列番号2の238~2064番目の塩基で示されるDNAや配列番号3の80~687残基に該当する部分で示されるタンパク質をコードする

DNAを用いて、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復させる目的に使用する場合、この配列に加え、ミトコンドリアへの移行配列が必要となる。

該ミトコンドリアへの移行配列としては、上記配列番号2の1～237番目の塩基で示されるDNA又は配列番号3の1～79番目のアミノ酸配列をコードするDNA、その他上述の公知の移行配列等が利用できる。

#### 【0090】

本発明者らは以下の実施例において、配列番号1に示された、ゲノムに存在する本来のプロモーターからターミネーターまでに含まれるイントロンを含んだRf遺伝子のDNAを、本来の形で植物に導入するために、植物形質転換用ベクターを作製した。コンティグの一部をなすクローンから配列番号1に示された塩基配列を制限酵素によって切り出した後、適当なクローニングベクターにサブクローニングした後、植物形質転換用ベクターpKM424, pBIGRZ2にサブクローニングした断片を導入し、当該断片を植物に導入可能なベクターを得た。このベクターを植物形質転換用アグロバクテリウムに導入した。このベクターを保持したアグロバクテリウムを植物に感染させることによって当該DNA断片が植物ゲノム中に組み込まれる。

#### 【0091】

本発明の遺伝子が適用される植物は、例えばナタネ、ヒマワリ、ダイズ、パーム椰子等の油量作物、例えばイネ、トウモロコシ、コムギ等の禾穀類、例えば、タバコ、ペチュニア等の花卉類、例えばトマト、ブロッコリー、キャベツ、白菜、人参等の各種の野菜類などが例示される。

このうち、ナタネ、キャベツ、白菜、ブロッコリー等のブラシカ属の植物やトマトなどが好ましく、特に好ましくは、ナタネ、キャベツ、白菜、ブロッコリーが挙げられ、最も好ましくは、ナタネである。

#### 【0092】

本明細書において、形質転換植物源としては、種子、芽生え、苗、カルス、培養細胞、植物体などが挙げられ、例えば、ナタネの場合には芽生えまたはプロトプラスト；ダイズの場合には芽生え、カルスまたは培養細胞；ヒマワリの場合には芽生え；パーム椰子の場合にはカルスまたは培養細胞；イネの場合には、芽生

え、カルス、培養細胞またはプロトプラスト；トウモロコシには、芽生え、苗、カルス、培養細胞またはプロトプラスト；コムギの場合には、芽生え、カルスまたは培養細胞；キャベツ、ブロッコリーの場合には、芽生え、カルス、培養細胞またはプロトプラスト；ニンジンの場合には、芽生え、カルス、培養細胞またはプロトプラスト等と言ったように、当業者が通常行うように、対象植物によって適宜好ましい部位を選択して行えばよい。

#### 【0093】

植物への形質転換法は常法に従って行うことができ、例えば、ベクターを一度アグロバクテリウムに導入した後に、アグロバクテリウムを植物細胞に感染させることで、ベクターを植物に導入する方法や、エレクトロポレーション法、DEAEデキストラン法、リン酸カルシウム法、ポリエチレングリコール法、パーティクルガン法などを用いてベクターを細胞へ直接導入する方法等を挙げることができる。

#### 【0094】

例えば、ナタネの場合に好ましい遺伝子導入法としては、下記に記載された方法が挙げられる。

スクロース等の糖類を炭素源として含んだ MS培地で無菌発芽させたナタネ品種の下胚軸を2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸、及びスクロースを含むMS培地上で前培養する。YEB培地で増殖させたアグロバクテリウムを遠心により集菌し、スクロースを含んだMS培地に再懸濁を行う。この懸濁液に、先のナタネ下胚軸を加え振とうさせた後、取り出した下胚軸を元の前培養培地に戻し3日間共存培養した後、ゼアチン、ベンジルアミノプリン等の植物ホルモン、カルベニシリン、及びカナマイシンを含む選択培地に移して選抜を行う。これにより、得られた緑色の再生芽を、ベンジルアミノプリン等の植物ホルモンを任意に含んだ伸長培地、引き続いてナフタレン酢酸、ベンジルアミノプリン等の植物ホルモンを任意に含んだ発根培地で培養することで再生個体を得ることができ、この個体をcms系統の個体と交配することにより、稔性が回復されたF1雑種を得ることができる。

#### 【0095】

このように植物に本発明のDNAを導入することにより、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することが可能になる。

尚、上記再生個体は、cms系統のナタネと交配し、その子孫の稔性を調査することで、発現の確認ができるが、cms細胞質を持つナタネを材料として形質転換を行った場合には、上記のように根を形成した形質転換体（再生個体）を通常の肥料を含む土壌に移し開花させることで、花粉稔性を調査でき、時間的にも操作的にも簡便で好ましい。

#### 【0096】

また、上記形質転換において、用いる細胞としてcms細胞質を有するナタネの細胞又は組織、好ましくは胚軸、子葉、葉、花粉、培養細胞、カルス、プロトプラストを利用して上述のように形質転換を行った場合には、上記の方法で得られる植物体（再生個体）を通常の肥料を含む土壌に移し開花させることで、花粉稔性が回復された植物個体を得ることができる。

すなわち、cms細胞を用い、該cms細胞に上述の遺伝子導入法で本発明のDNAを導入し、該DNAが核に組み込まれている細胞をカナマイシン等の抗生物質耐性あるいは除草剤耐性選抜マーカーを指標にして選抜した後、前述のような伸長培地及び発根培地で培養することにより該DNAが核に組み込まれた植物体を得ることができる。この植物体は、雄性不稔形質が回復され可稔となる。

#### 【0097】

細胞質雄性不稔回復に関与する遺伝子を検出する方法としては、請求項1から4の何れかに記載のDNAから任意に設定した15～50merのオリゴヌクレオチドプライマー、又は、請求項1から4の何れかに記載のDNAの全部又は1部からなる少なくとも15mer以上のプローブを使用し、目的の生物試料中に、該プライマーにより増幅される塩基配列の量、又は、プローブにより検出される塩基配列の量が、1ゲノム中に1遺伝子以上あることを確認することにより行うことができる。

#### 【0098】

具体的な確認手法としては、例えば、PCR法、サザンハイブリダイゼーション法などがあげられ、このうち、PCR法が好ましい。これらの手法は、Molecu

lar Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989. 以後 "モレキュラークローニング第2版"と略す) 等に記載されている方法に準じて行うことができる。

#### 【0099】

1ゲノム中に1遺伝子以上あることを確認するためには、PCR法では簡易法として同じコピー数のDNAを鋳型にして、同程度の増幅が認められることが必要であり、より正確には定量PCR法を用いて、内部標準として1ゲノム中に1遺伝子存在することがわかっている既知の遺伝子を増幅させる任意のプライマーを用い、同量の生物試料中に、この既知の遺伝子の増幅量と該プライマーにより増幅される塩基配列の量を比較することで確認できる。サザンハイブリダイゼーション法では、当該DNAが1ゲノム中に1遺伝子あることがわかっている稔性回復系統植物個体のDNAと目的の植物試料のDNAを等量ずつ比較して、検出されるDNAの量が同じ又はそれ以上であることを確認する。

#### 【0100】

PCR法に用いるプライマーは、たとえば配列番号1もしくは配列番号2に記載のDNA配列と同一の、または相補性を有する15~50merのオリゴヌクレオチドがあげられる。

サザンハイブリダイゼーション法に用いるプローブは、配列番号1もしくは配列番号2に記載のDNA配列と同一の2本鎖DNAの全域もしくは少なくとも15mer以上のその一部分、または1本鎖DNAまたはその相補鎖の全域もしくは少なくとも15mer以上のその一部分があげられる。また、先に述べたようにプローブとして使用するDNAの塩基配列と一定以上の相同性を有するDNAが挙げられる。ここで言う一定以上の相同性とは、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは93%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは97%以上である。なお、ここで言う一定以上の相同性を有するDNAとしては、上記した相同性を有するポリヌクレオチドおよびその相補鎖ポリヌクレオチドの両方を包含する。

#### 【0101】

以上に述べた遺伝子を検出する方法は、形質転換体において当該DNAが組み

込まれているかどうかを確認することだけでなく、交配により R f 遺伝子の導入を試みた個体においても、R f 遺伝子の有無を確認する手段として用いることができる。この方法を用いれば、細胞質雄性不稔個体に R f 遺伝子を導入した場合、開花する前に R f 遺伝子の有無を確認することが可能である。また、通常の細胞質を持つ個体に R f 遺伝子を導入した場合は、開花時の花粉を細胞質雄性不稔個体に交配して得られた次世代の個体の稔性を確認しなければならないが、この方法を用いることでこれ以前に R f 遺伝子の有無を確認できる。このような利用方法は、一般的にマーカー DNA の利用またはマーカー DNA 育種と呼ばれている。R f 遺伝子の場合は、R f 遺伝子のマーカー DNA (R f マーカー) としての利用が考えられる。R f マーカーは、先に述べたように、当該 DNA を導入した組み換え個体や非組み換え体である交配により R f 遺伝子を導入した植物を母本として用い、実用品種を育種していく上で、重要である。

#### 【0102】

尚、導入 DNA が R f 遺伝子として機能するかどうかを確認するには、上述のように形質転換体の稔性回復を確認することによっても可能であるが、その他にも、下記に示すような方法でも行うことができる。

先に述べたように、R f 遺伝子は、cms 原因タンパク質である ORF 125 または ORF 138 タンパク質のミトコンドリア内の蓄積量を減少させることにより、植物体の稔性を回復させる。従って形質転換個体のミトコンドリアにおいて、ORF 125 または ORF 138 タンパク質蓄積量の減少を確認することにより、導入遺伝子が R f 遺伝子であることが確認できる。

#### 【0103】

ミトコンドリアにおける ORF 125 または ORF 138 タンパク質蓄積量の減少を確認する方法としては、本明細書に記述した条件に従ってウエスタンブロッティング法により ORF 125 または ORF 138 タンパク質を検出した時に、内部標準として用いるミトコンドリアゲノム由来のタンパク質に対する抗体、例えば、N. Koizuka, et al. Theor Appl Genet, 100:949-955, 2000 に記載されている、抗 F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>ATPase (以下 ATPase と省略) のシグナル量が、細胞質雄性不稔個体と、稔性回復個体または細胞質雄性不稔個体に該 DNA を導入した形質転換個

体とで等量であって、かつ、細胞質雄性不稔個体のORF125またはORF138タンパク質の蓄積量と比べて、稔性回復個体または細胞質雄性不稔個体に該DNAを導入した形質転換個体での蓄積量が50%より多く減少、好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上減少していることを確認する方法である。

#### 【0104】

実際には、ORF125を有する細胞質雄性不稔ダイコンのつぼみでは、稔性回復遺伝子Rfが導入されると、ORF125タンパク質の蓄積量は激減し、ほとんど検出されない。またナタネでは、細胞質ORF125を有する細胞質雄性不稔ナタネに、交配により稔性回復遺伝子が導入された稔性回復ナタネのつぼみでは、ORF125タンパク質の蓄積量が80%以上減少していることが観察されている。また、実施例においても、細胞質雄性不稔個体に当該DNAを導入した形質転換ナタネのつぼみでは、ORF125タンパク質の蓄積量が80%以上減少していることが観察されている。

尚、上述の方法における、ORF125やORF138タンパク質に対する抗体は、下記のような一般的な手法を用いることにより得ることができる。すなわち、抗原としてこれらのタンパク質を動物に免疫することで抗血清が得られ、さらにproteinAを結合したアフィニティーカラムを用いることでイムノグロブリンG抗体を精製することが出来る。用いる抗原としては、発現している細胞質雄性不稔植物やこの培養細胞から、定法によりタンパク質を精製する事で得られる。また、ORF125やORF138遺伝子を発現ベクターに繋いで、大腸菌や酵母において発現させ、同様に精製することで得られる。さらには、ORF125やORF138の全長もしくは一部分を化学合成したペプチドも抗原としてもちいる事ができる。ATPAに対する抗体も同様の手法で得ることができる。

#### 【0105】

さらに、cms細胞質を有し、かつ、本発明のDNAを有する細胞に、さらに誘導型プロモーターと共に本発明の遺伝子の一部又は全部を導入することで、本発明のDNAの発現を特異的にしかも一時的に制御することで、ハイブリッド種子生産に必要な雄性不稔性維持系統（維持系統）を必要としない新しいハイブリ

ッド種子生産システムを作ることができる。

#### 【0106】

すなわち、通常、cms 系統のナタネは不稔であるため、cms 系統を増殖、維持するためには、別途、cms 及び Rf が関与していない維持系統というものが必要であり、従来、ハイブリッド種子の生産のためには Rf 系統、cms 系統、維持系統という 3 つの系統の植物を必要としたが、本発明により、Rf 遺伝子が単離・同定されたため、ハイブリッド生産の際に、化学物質によるプロモーターの誘導を行い、回復遺伝子の発現を制御する方法を用いることにより、維持系統が無くとも増殖、維持が可能となる cms 系統が構築できる。

#### 【0107】

具体的には、外部から誘導するプロモーター、例えば、薬剤感受性のあるプロモーターを有するベクターに、本発明の遺伝子の一部または全長をアンチセンスあるいはセンスの向きで組み込み、該ベクターを用いて、cms 細胞質を有し、かつ、本発明の DNA を有する細胞を形質転換する。

cms 細胞質を有し、かつ、本発明の DNA を有する細胞としては、上述の方法に従い、cms 細胞質を有する細胞を本発明の DNA で形質転換したものだけでなく、cms 系統と Rf 系等を交配して得られたものでもよい。

上述の誘導可能なプロモーターとしては、例えば、特開平 6-46697 で知られており、ベクターの作成及び形質転換の方法としては上述と同様の手法が挙げられる。

#### 【0108】

上記方法により得られる cms 細胞質を有し、かつ、本発明の DNA を有する細胞であって、さらに誘導型プロモーターと共に本発明の DNA の一部又は全部が組み込まれた形質転換体は、通常、プロモーターが誘導されていないため、元々存在する Rf 遺伝子により植物は可稔性を示し、該系統の維持も自家受粉により行うことができるが、ハイブリッド生産の際には、この植物にプロモーターを誘導させる能力を有する化学物質を作用させ、プロモーターが誘導されることにより Rf 遺伝子の発現が阻害される。これにより、その植物は雄性不稔となるため、ハイブリッド種子生産時に cms 系統として使用することができる。



従って、この方法を用いることで、cms系統であっても増殖、維持が自家受粉で行えることになるので、従来はハイブリッド種子の生産のために3つの系統が必要であったものが、維持系統は必要なくなり、生産コストを大幅に減少させることが可能になる。

以下、実施例について更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によって何ら限定されるものではない。

#### 【0109】

##### 【実施例】

実施例1：細胞質雄性不稔回復遺伝子に連鎖するDNAマーカーの単離とゲノム地図の作製

稔性回復遺伝子(Rf遺伝子)を単離するために、まず、Rf遺伝子の近傍に位置するDNAマーカーを単離し、このDNAマーカーとRf遺伝子の遺伝距離の関係を示したゲノムの地図を作製する必要がある。その出発点としてRf領域のポジショナルクローニングを行った。

#### 【0110】

DNAマーカー単離法には、AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 法(Nucleic Acids Research, 1995, Vol.23, No.21 4407-4414)に準じた、GIBCO BRL社のAFLP Analysis System I AFLP Starter Primer Kitに従ってAFLPを行った。マーカーとの遺伝距離を測定する材料として、cms系統コセナダイコン(Raphanus sativus cv. Kosena)の1個体((KC2/KA1)-1)とRf系統である園紅ダイコン(Raphanus sativus cv. Yuanhong)の1個体(Yuan10-3)とをN. Koizuka, et al. Theor Appl Genet, 100:949-955 2000に記載の方法に準じ、交配したダイコンF1世代8個体を自家受粉して得られた約2100個体のF2集団を用いた。その結果、Rf遺伝子を挟むような形で、両側にそれぞれ0.2~0.3cMの遺伝距離で離れた位置に連鎖するマーカーを5つ単離した。各DNAマーカーとRf遺伝子の遺伝的距離を示したゲノムの地図を図1に示す。

#### 【0111】

実施例2：ゲノム地図を基にしたコンティグの作製とRf遺伝子の解析

ゲノム地図作成に続いてはその位置に対応するゲノムDNAをクローン化し、Rf遺伝子を挟むDNA マーカー間を繋ぐ事が必要になる。ここで、DNA マーカーとRf遺伝子との距離が離れているため、ゲノムDNA断片を持つクローンを複数個繋げる事によって、DNAマーカー間をカバーするRf遺伝子領域のコンティグを作製した。

#### 【0112】

ゲノムDNA断片をもつクローンの集合体をゲノミックライブラリーといい、我々は2種類のライブラリーを作製した。DNA供与体として、F<sub>2</sub>集団を作製した時に利用した回復系統の親と同じ園紅ダイコンより、常法に従い、CTAB法 (Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980) Nucleic Acids Res., 8, 4321) によりゲノムDNAを調製した。ライブラリーは、ラムダベクターとしてλDASHIIベクター (STRATAGENE社製) を用いて、平均長20kb、集団数 $1.5 \times 10^5$ 個のラムダファージライブラリーを作製した。また、コスミドベクターとしてpWEB::TNCベクター (EPICENTRE TECHNOLOGIES社製) を用いて、平均長40kb、集団数 $5.5 \times 10^4$ 個のコスミドライブラリーを作製した。

#### 【0113】

コンティグの作製は最初に、Rf遺伝子の両側に位置するDNAマーカーを指標に、上記で作製したラムダファージライブラリーから、プラークハイブリダイゼーション法を用いて、ラムダクローンを単離した。またコスミドライブラリーから、コロニーハイブリダイゼーション法を用いてコスミドクローンを単離し、図1に示すような両端のDNAマーカー間をカバーするコンティグを完成した。コンティグの一部を成すコスミドクローンNIT7/2とT03-2は常法により、塩基配列を決定した。

#### 【0114】

続いて、上記コンティグの一部を成すコスミドクローンNIT7/2とT03-2の塩基配列を、「Genscan」 (三菱スペースソフトウェア社製) を用いて、ダイコンとゲノムDNA 配列が似通っており、最近全ゲノム配列が決定されたシロイヌナズナに対するパラメーターを加味して解析した。その結果、Rf遺伝子を発現すると思われるプロモーター部分とイントロンを含んだ構造遺伝子部分とターミネ

ーター部分を発見した。さらに、イントロンが除かれたタンパク質に翻訳される形の遺伝子とその遺伝子に対するアミノ酸配列を得た。

#### 【0115】

##### 実施例3：ゲノミックDNA領域のサブクローニング

「Genscan」で推定されたプロモーターからターミネーターを十分に含む、配列番号1に記載された1～8553の塩基配列からなるDNAのHpaI-SwaI断片(8546bp)を、フラグメント回収用アガロース(FMC社製)を用いたゲル電気泳動によりベクターと分離した。DNA断片を含むゲルをゲル分解酵素(Epicentre Technologies社製)により消化してDNAを回収した。さらに、得られた断片を制限酵素BamHIにより切断したクローニング断片を得た。これらDNA断片を、pGEM-T easyベクター(Promega社製)にサブクローニングして、cds6BT/pGEM-T easyを得た。以下、詳細に記述する。

#### 【0116】

100 $\mu$ lの1 $\times$ K制限酵素緩衝液(20mM Tris-HCl(pH8.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, 100mM KCl)中に、1 $\mu$ gの NIT7/2コスミドDNAと10 unitの制限酵素HpaI(宝酒造社製)を加え、37 $^{\circ}$ Cにて1時間加温した。

#### 【0117】

加温後、10 $\mu$ lの3M酢酸ナトリウム(pH5.6)と250 $\mu$ lのエタノールを加えて攪拌後、-80 $^{\circ}$ Cにて5分間冷却して、15000rpm、4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心する。上清を除き、さらに1mlの70%エタノールを静かに加え、15000rpm、4 $^{\circ}$ Cで5分間遠心する。上清を除き、遠心真空乾燥機を用いて、沈殿を5分間乾燥させる。回収したDNA沈殿に、滅菌水89 $\mu$ lを加えて溶かす。

#### 【0118】

溶かしたDNA溶液に、10 $\mu$ lの10 $\times$ H制限酵素緩衝液(500mM Tris-HCl(pH7.5), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Dithiothreitol, 1000mM NaCl)、1 $\mu$ lの10unit/ $\mu$ l制限酵素SwaI(宝酒造社製)を加え、25 $^{\circ}$ Cにて1時間加温した。11 $\mu$ lの10 $\times$ loading緩衝液(1% SDS, 50% Glycerol, 0.05% Bromophenol Blue)を加えた。

#### 【0119】

1.2gの低融点アガロースSeaPlaqueGTG agarose(FMC社製)と、150mlの1 $\times$ TA

E(40mM Tris-acetate, 1mM EDTA) 緩衝液を混和後、100℃に加熱してアガロースを溶かし、45℃まで攪拌しながら冷却した。14×15cmのゲルトレイに30mm幅×1mm厚のコームを設置し、冷却したゲルを流し込み固めた。ゲルコームにloading Dyeを加えたDNAを流し込み、1×TAE、30V/30cmの電圧で18時間電気泳動した。

#### 【0120】

電気泳動したゲルを、0.5μg/ml エチジウムブロミド/1×TAE溶液に移し、30分染色した。ゲルを365nmの長波紫外線を放射したトランスイルミネーターの上に乗せ、目的の8546bpの断片を、滅菌したメスを用いて切り出した。さらにゲルを約1mm角の断片になるように刻み、あらかじめ秤量した2mlのマイクロチューブに移し、ゲルの重さを秤量した。

#### 【0121】

ゲルの重さ50mgに対して1μl の50×GELase Buffer(2M Bis-Tris(pH6.0), 2M NaCl) を加えた。ゲルの入ったチューブを68℃に加温したドライヒートブロックに入れ、時々チューブを上下にしながら攪拌し、10分間加温して、ゲルを完全に溶かした。このチューブを45℃のドライヒートブロックに移し、時々チューブを上下にしながら攪拌し、5分間加温した。このチューブに、ゲルの重さ200mgに対して1unitのGELase (Epicentre Technologies社製)を加えて45℃のドライヒートブロックで、時々チューブを上下にしながら攪拌し、30分間加温した。

#### 【0122】

ゲル容積に対して、1/3容量の10M 酢酸アンモニウム(pH7.0)を加え攪拌し、15000rpm, 5分間遠心した。上清を新しい2mlのマイクロチューブに移し、上に対して2容量のエタノールを加えた。チューブを攪拌後、15000rpm、4℃で20分間遠心した。上清を除き、さらに1mlの70%エタノールを静かに加え、15000rpm、4℃で5分間遠心した。上清を除き、遠心真空乾燥機を用いて、沈殿を5分間乾燥させた。沈殿に20μl のTE緩衝液(10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA)を加え、完全に溶かし、DNA断片を回収した。

#### 【0123】

回収した20μlのDNA溶液に、10μlの10×K制限酵素緩衝液(200mM Tris-HCl(pH8.5), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Dithiothreitol, 1000mM KCl)、68μlのdH<sub>2</sub>O、

2 $\mu$ l の10 unit/ $\mu$ l の制限酵素BamHI (宝酒造社製) を加え、30℃にて1時間加温した。加温後、10 $\mu$ l の3M酢酸ナトリウム(pH5.6)と250 $\mu$ l のエタノールを加えて攪拌後、-80℃にて5分間冷却して、15000rpm、4℃で15分間遠心する。上清を除き、さらに1ml の70%エタノールを静かに加え、15000rpm、4℃で5分間遠心する。上清を除き、遠心真空乾燥機を用いて、沈殿を5分間乾燥させる。回収したDNA沈殿に、滅菌水20 $\mu$ l を加えて溶かす。55 $\mu$ l の滅菌水、10 $\mu$ l の10x PCR 緩衝液(100mM Tris-HCl(pH8.3), 500mM KCl)、6 $\mu$ l の25mM MgCl<sub>2</sub>、8 $\mu$ l の2.5mM dNTP mix、1 $\mu$ l の5 unit/ $\mu$ l のrTaq DNA polymerase (宝酒造社製) を加えて混和後、72℃で30分間加温して、3'末端にdATPを付加した。

#### 【0124】

限外ろ過フィルターユニット:Microcon-50 (ミリポア社製) に、上記反応液を移し、5000rpm、4℃で20分間遠心した。トラップの水を捨て、再度100 $\mu$ l の滅菌水を加えて、5000rpm、4℃で20分間遠心した。20 $\mu$ l のTE緩衝液(10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA) を加え、フィルターユニットを取り外し、向きを逆さにして新しいマイクロチューブに装着した。3000rpm、4℃、5分間遠心して、フィルターユニットのDNA を回収した。

#### 【0125】

上述の方法で得られた5 $\mu$ l の精製されたDNAに、1 $\mu$ l の50ng/ $\mu$ l pGEM-T easy ベクター (Promega社製)、6 $\mu$ l のDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)のI 溶液を混和後、16℃で30分間インキュベートした。

#### 【0126】

限外ろ過フィルターユニット:Microcon-50 (ミリポア社製) に、上記反応液を100 $\mu$ l の滅菌水とともに移し、5000rpm、4℃で20分間遠心した。トラップの水を捨て、再度100 $\mu$ l の滅菌水を加えて、5000rpm、4℃で20分間遠心した。フィルターユニットを取り外し、向きを逆さにして新しいマイクロチューブに装着した。3000rpm、4℃、5分間遠心して、フィルターユニットのDNA を回収した。

#### 【0127】

回収したDNAをチューブごと氷上に立て冷却した。30 $\mu$ l のエレクトロポレーション用大腸菌DH10B (Gibco BRL社製) をチューブに入れ、軽く混ぜた。予め

氷上で冷やしたエレクトロポレーション用（電極間隔1mm）キュベット（USA Scientific Plastics社製）に、DNAと混和した大腸菌を移した。Electro Cell Manipulator 600（BTX社製）を用いて、1.25kv、129 $\Omega$ 、50 $\mu$ Fの条件でエレクトロポレーションを行い、その後直ちに37℃に温めた500 $\mu$ lのSOC培地（Gibco BRL社製）をキュベットに加えた。大腸菌を10mlの培養チューブに移し、37℃で1時間振とう培養した。100 $\mu$ g/mlのAmpiciline（和光純薬社製）、20 $\mu$ g/mlのX-Gal（宝酒造社製）、1mMのIPTG（宝酒造社製）を加えたLB寒天培地（1%Bacto-Tryptone, 0.5%Bacto-Yeast Extract, 1%NaCl, 1.5% Bacto-Agar）に、培養した大腸菌を拡げ、18時間以上37℃で培養した。

#### 【0128】

寒天培地上に現れた白いコロニーを、100 $\mu$ g/mlのAmpicillinを加えた2mlのLB培地にて、37℃で18時間以上培養した。培養した大腸菌から、定法によりプラスミドDNAを抽出した。プラスミドDNAに目的の断片がクローニングされていることを制限酵素EcoRI（宝酒造社製）で切断して確認して、cds6BT/pGEM-T easyを得た。

#### 【0129】

上述の方法で得たcds6BT/pGEM-T easyを保持したそれぞれの大腸菌DH10Bを、100 $\mu$ g/mlのAmpicillinを加えた100mlのLB培地にて、37℃で18時間培養した。アルカリSDS法により、Qiagen Midiキット（キアゲン社製）を用いて精製した。

#### 【0130】

実施例4-1：植物形質転換用ベクターの作製(1)

cds6BT/pGEM-Teasyを制限酵素EcoRIで切断後、フラグメント回収用アガロースを用いたゲル電気泳動によりベクターと分離し、回収されたDNA断片を植物形質転換用ベクターpKM424（pKM424にCaMV35Sプロモーター：GUS gene：NOSターミネーターの断片を加えたベクターがpLAN421（Plant Cell Reports 10(1991) 286-290ベクター）のEcoRI部位にクローニングして、植物形質転換用ベクターcds6BT/pKM424とした。以下に詳細を示す。

#### 【0131】

100 $\mu$ lの1×H制限酵素緩衝液（50mM Tris-HCl（pH7.5），10mM MgCl<sub>2</sub>，1mM Dithi

othreitol, 100mM NaCl)中に、 $1\mu\text{g}$  のcds6BT/pGEM-T easy DNAと10 unitの制限酵素EcoRI (宝酒造社製)を加え、 $37^{\circ}\text{C}$ にて1時間加温した。

以下、上記のHpaI-SwaI断片を取り出した同様の方法で、cds6BT/pGEM-T easy からcds6BTを含むEcoRI断片を分離回収した。

#### 【0132】

$100\mu\text{l}$ の1×H制限酵素緩衝液(50mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM Dithiothreitol, 100mM NaCl)中に、 $1\mu\text{g}$ の植物形質転換用ベクターpKM424と10 unitの制限酵素EcoRI (宝酒造社製)を加え、 $37^{\circ}\text{C}$ にて1時間加温した。加温後、 $100\mu\text{l}$ の1M Tris-HCl(pH8.0)と、1 unitのBacterial Alkaline Phosphatase(宝酒造社製)を加えて混和後、 $50^{\circ}\text{C}$ で1時間加温して脱リン酸化した。

#### 【0133】

$200\mu\text{l}$ のTE緩衝液(10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA)で飽和したフェノール・クロロホルムを加え、激しく攪拌した。 $15000\text{rpm}$ 、5分間遠心後、上清を新しいチューブに移す。同様の操作をもう一度繰り返し、タンパク質を取り除いた。 $20\mu\text{l}$ の3M酢酸ナトリウム(pH5.6)と $500\mu\text{l}$ のエタノールを加えて攪拌後、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて5分間冷却して、 $15000\text{rpm}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ で15分間遠心した。上清を除き、さらに1mlの70%エタノールを静かに加え、 $15000\text{rpm}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ で5分間遠心した。上清を除き、遠心真空乾燥機を用いて、沈殿を5分間乾燥させた。沈殿に $100\mu\text{l}$ のTE緩衝液(10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA)を加え、完全に溶かし、 $10\text{ng}/\mu\text{l}$ の濃度とした。

#### 【0134】

$10\mu\text{l}$ の精製されたEcoRI断片、 $1\mu\text{l}$ の脱リン酸化されたpKM424ベクター、 $11\mu\text{l}$ のDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)I溶液を混和後、 $16^{\circ}\text{C}$ で30分間インキュベートした。

#### 【0135】

限外ろ過フィルターユニット:Microcon-50 (ミリポア社製)に、上記反応液を $100\mu\text{l}$ の滅菌水とともに移し、 $5000\text{rpm}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ で20分間遠心した。トラップの水を捨て、再度 $100\mu\text{l}$ の滅菌水を加えて、 $5000\text{rpm}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ で20分間遠心した。フィルターユニットを取り外し、向きを逆さにして新しいマイクロチューブに装着した。 $3000\text{rpm}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 、5分間遠心して、フィルターユニットのDNAを回収した。

## 【0136】

回収したDNAをチューブごと氷上に立て冷却した。30 $\mu$ lのエレクトロポレーション用大腸菌DH10B (Gibco BRL社製) をチューブに入れ、軽く混ぜた。予め氷上で冷やしたエレクトロポレーション用 (電極間隔1mm) キュベット (USA Scientific Plastics社製) に、DNA と混和した大腸菌を移した。Electro Cell Manipulator 600 (BTX社製) を用いて、1.25kv、129 $\Omega$ 、50 $\mu$ Fの条件でエレクトロポレーションを行い、その後直ちに37℃に温めた500 $\mu$ lのSOC培地 (Gibco BRL社製) をキュベットに加えた。大腸菌を10mlの培養チューブに移し、37℃で1時間振とう培養した。50 $\mu$ g/mlのSpectinomycin (Sigma社製) を加えたLB寒天培地 (1%Bacto-Tryptone, 0.5%Bacto-Yeast Extract, 1%NaCl, 1.5% Bacto-Agar) に、培養した大腸菌を拡げ、18時間以上37℃で培養した。

## 【0137】

寒天培地上に現れたコロニーを、50 $\mu$ g/mlのSpectinomycinを加えた2mlのLB培地にて、37℃で18時間以上培養した。培養した大腸菌から、定法によりプラスミドDNAを抽出した。プラスミドDNAにBamHI部位からHpaI部位がクローニングされていることを制限酵素HindIII (宝酒造社製) で切断して確認し、cds6BT/pKM424とした。

cds6BT/pKM424を保持した大腸菌DH10Bを、50 $\mu$ g/mlのSpectinomycinを加えた250mlのLB培地にて、37℃で18時間培養した。アルカリSDS法により、Qiagen Midiキット (キアゲン社) を用いて精製した。

## 【0138】

## 実施例 4-2: 植物形質転換用ベクターの作製 (2)

配列番号1に記載の塩基配列を十分に保持するラムダクローンCHI (図2参照、クローニング断片長約17kb) をマルチプルクローニング部位に存在する制限酵素NotI (宝酒造社製) で切断後、フラグメント回収用アガロースを用いたゲル電気泳動によりベクターと分離し、回収されたDNA断片を植物形質転換用ベクターpBGRZ2 (バイオサイエンスとインダストリー55(1997)37-39) のNotI部位にクローニングして、植物形質転換用ベクターCHI/pBGRZ2とした。以下に詳細を示す。



## 【0139】

100  $\mu$ l の 1 $\times$ H 制限酵素緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, 100mM NaCl, 0.01% BSA, 0.01% TritonX-100) 中に、1  $\mu$ g の ラムダ クローンCHI DNA と 10 unit の 制限酵素NotI (宝酒造社製) を加え、37℃ にて 1 時間加温した。以下、上記のHpaI-SwaI断片を取り出した同様の方法で、ラムダ クローンCHIのNotI断片を分離回収した。

## 【0140】

100  $\mu$ l の 1 $\times$ H 制限酵素緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, 100mM NaCl, 0.01% BSA, 0.01% TritonX-100) 中に、1  $\mu$ g の 植物形質 転換用ベクターpBGRZ2と 10 unit の 制限酵素NotI (宝酒造社製) を加え、37℃ にて 1 時間加温した。加温後、100  $\mu$ l の 1M Tris-HCl (pH8.0) と、1 unit の Bacteria l Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) を加えて混和後、50℃ で 1 時間加温して脱 リン酸化した。

## 【0141】

200  $\mu$ l の TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA) で飽和したフェノール・ クロロホルムを加え、激しく攪拌した。15000rpm、5分間遠心後、上清を新しい チューブに移す。同様の操作をもう一度繰り返し、タンパク質を取り除いた。20  $\mu$ l の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.6) と 500  $\mu$ l の エタノールを加えて攪拌後、-80℃ にて 5 分間冷却して、15000rpm、4℃ で 15 分間遠心した。上清を除き、さらに 1ml の 70 % エタノールを静かに加え、15000rpm、4℃ で 5 分間遠心した。上清を除き、遠心真 空乾燥機を用いて、沈殿を 5 分間乾燥させた。沈殿に 100  $\mu$ l の TE 緩衝液 (10mM Tri s-HCl (pH8.0), 1mM EDTA) を加え、完全に溶かし、10ng/ $\mu$ l の濃度とした。

## 【0142】

10  $\mu$ l の 精製されたNotI断片、1  $\mu$ l の 脱リン酸化されたpBGRZ2ベクター、11  $\mu$  l の DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) I 溶液を混和後、16℃ で 30 分間イン キュベートした。

限外ろ過フィルターユニット:Microcon-50 (ミリポア社製) に、上記反応液を 100  $\mu$ l の滅菌水とともに移し、5000rpm、4℃ で 20 分間遠心した。トラップの水を 捨て、再度 100  $\mu$ l の滅菌水を加えて、5000rpm、4℃ で 20 分間遠心した。フィルタ

ーユニットを取り外し、向きを逆さにして新しいマイクロチューブに装着した。  
3000rpm、4℃、5分間遠心して、フィルターユニットのDNAを回収した。

#### 【0143】

回収したDNAをチューブごと氷上に立て冷却した。30 $\mu$ lのエレクトロポレーション用大腸菌DH10B (Gibco BRL社製) をチューブに入れ、軽く混ぜた。予め氷上で冷やしたエレクトロポレーション用 (電極間隔1mm) キュベット (USA Scientific Plastics社製) に、DNAと混和した大腸菌を移した。Electro Cell Manipulator 600 (BTX社製) を用いて、1.25kv、129 $\Omega$ 、50 $\mu$ Fの条件でエレクトロポレーションを行い、その後直ちに37℃に温めた500 $\mu$ lのSOC培地 (Gibco BRL社製) をキュベットに加えた。大腸菌を10mlの培養チューブに移し、37℃で1時間振とう培養した。25 $\mu$ g/mlのKanamycin (和光純薬社製) を加えたLB寒天培地 (1%Bacto-Tryptone, 0.5%Bacto-Yeast Extract, 1%NaCl, 1.5% Bacto-Agar) に、培養した大腸菌を拡げ、18時間以上37℃で培養した。

#### 【0144】

寒天培地上に現れたコロニーを、25 $\mu$ g/mlのKanamycinを加えた2mlのLB培地にて、37℃で18時間以上培養した。培養した大腸菌から、定法によりプラスミドDNAを抽出した。プラスミドDNAに目的の断片がクローニングされていることを制限酵素HindIII (宝酒造社製) で切断して確認し、CHI/pBGRZ2とした。

CHI/pBGRZ2を保持した大腸菌DH10Bを、25 $\mu$ g/mlのKanamycinを加えた250mlのLB培地にて、37℃で18時間培養した。アルカリSDS法により、Qiagen Midiキット (キアゲン社) を用いて精製した。

#### 【0145】

実施例5: アグロバクテリウムへの植物形質転換用ベクターの導入

アグロバクテリウムのコンピテントセルを調製し、実施例4-1及び4-2で得られたcds6BT/pKM424ベクター及びCHI/pBGRZ2ベクターのそれぞれを、調製した植物形質転換用アグロバクテリウムEHA101に導入した。以下、詳細に示す。

#### 【0146】

アグロバクテリウムEHA101のエレクトロポレーション用コンピテントセルを以下の方法で作製した。アグロバクテリウムEHA101を、50 $\mu$ g/ml Kanamycin (和光

純薬社製), 25  $\mu$ g/ml Chloramphenicol (和光純薬社製) を加えたLB寒天培地上でストリークして、28℃で24時間以上培養し、シングルコロニーを得た。50  $\mu$ g/ml Kanamycin, 25  $\mu$ g/ml Chloramphenicolを加えたLB培地20mlを50ml遠心管に入れ、直径1mm程度のコロニーを植菌し、28℃で40時間振とう培養した。40時間後、遠心管の蓋を一度開閉して、さらに4時間同様に培養した。培養液を1500×g, 4℃で遠心して集菌した。上清を捨てたチューブに40mlの氷冷した滅菌10%グリセロールを入れ、菌体を再懸濁し、1500×g, 4℃で遠心して集菌した。この操作を2回繰り返した。得られた菌体に氷冷した500  $\mu$ lの滅菌10%グリセロールを加え、再懸濁した。滅菌したマイクロチューブに100  $\mu$ lずつ菌体を分注し、液体窒素で凍結後、-80℃フリーザーに保存した。

#### 【0147】

アグロバクテリウムEHA101のエレクトロポレーション用コンピテントセルを氷水上で溶かした。予め冷やした1.5mlチューブに40  $\mu$ lのエレクトロコンピテントセルを入れ、それぞれ100ngのcds6BT/pKM424 又は、CHI/pBGRZ2のプラスミドDNAを加えて軽く混和した。

#### 【0148】

予め氷上で冷やしたエレクトロポレーション用 (電極間隔1mm) キュベット (US A Scientific Plastics社製) にDNA と混和したアグロバクテリウムを移す。Electro Cell Manipulator 600 (BTX社製) を用いて、1.44kv、129  $\Omega$ 、50  $\mu$ Fの条件でエレクトロポレーションを行い、その後直ちに30℃に温めた500  $\mu$ lのSOC培地 (Gibco BRL社製) をキュベットに加えた。アグロバクテリウムを10mlの培養チューブに移し、30℃で1時間振とう培養する。

cds6BT/pKM424ベクターを導入したアグロバクテリウムは50  $\mu$ g/ml Kanamycin (和光純薬社製), 25  $\mu$ g/ml Chloramphenicol (和光純薬社製), 50  $\mu$ g/ml Spectinomycin (Sigma社製), 2.5  $\mu$ g/ml Tetracycline (Sigma社製) を加えたLB寒天培地 (1% Bacto-Tryptone, 0.5% Bacto-Yeast Extract, 1% NaCl, 1.5% Bacto-Agar) に、培養したアグロバクテリウムを拡げ、24時間以上28℃で培養した。

CHI/pBGRZ2ベクターを導入したアグロバクテリウムは50  $\mu$ g/ml Kanamycin (和光純薬社製), 25  $\mu$ g/ml Chloramphenicol (和光純薬社製), 30  $\mu$ g/ml Hygro

mycin(Sigma社製)を加えたLB寒天培地に、培養したアグロバクテリウムを拡げ、24時間以上28℃で培養した。

#### 【0149】

寒天培地上に現れたコロニーを、それぞれのベクターごとに適合した上記の抗生物質を加えた2mlのLB培地にて、30℃で24時間以上培養した。培養したアグロバクテリウムから、定法によりプラスミドDNAを抽出し、cds6BT/pKM424ベクターもしくはCHI/pBGRZ2ベクターがアグロバクテリウムに導入されていることを制限酵素HindIII(宝酒造社製)で切断して確認した。確認されたクローンは、24時間培養した培養液に滅菌80%グリセロールを等量加えて混和後、-80℃に保存し、ナタネの形質転換に用いた。

#### 【0150】

##### 実施例6：ナタネ形質転換体の作製

ナタネへの形質転換は以下のように行った。ダイコン由来のcms原因遺伝子orf125をもつCMSナタネ(SW18)の種子を10%の次亜塩素酸溶液で滅菌処理し、ホルモンを含まないMS培地(T. Murashige and F. Skoog Physiol. Plant. 15: 485, 1962)で発芽させた。発芽後7日-14日の幼植物から胚軸部分だけを切り取り3-5mmの長さに切り分け、MS培地(シグマ社 M5519)+しょ糖3%+2,4-D 1mg/l、アガロース(シグマ社、typeI)0.4%で23度、12-16時間前培養した。このとき、保護培養のためにタバコ由来の細胞系統BY-2と共存培養を行った。

#### 【0151】

一方CHI/pBGRZ2を含むアグロバクテリウムを28℃で8-48時間培養し、OD<sub>600</sub>=1.0程度まで増殖させた。アグロバクテリウムの菌体は液体のMSホルモンフリー培地に懸濁した。切り分けた胚軸とこのアグロバクテリウム溶液を混ぜ合わせ、約20分共存培養した。共存培養後、アグロバクテリウムをろ紙で除去した胚軸は例えばMS基本培地+B5ビタミン(シグマ社、M0404)+スクロース3%+2,4-D 1mg/lの培地で2日間培養し、感染させた。感染後、MS基本培地+B5ビタミン+スクロース3%+2,4-D 1mg/lに抗生物質カルベニシリン(ファイザー社、ゼオペンまたはGIBCO-BRL社 Carbenicillin disodium salts)を500mg/

1の濃度で添加した除菌培地に胚軸を移植し、アグロバクテリウムを除去した。

#### 【0152】

上述の除菌培地で5日から1週間経過した後、胚軸はMS基本培地+B5ビタミン+スクロース1%+ベンジルアミノプリン3mg/l+カーベニシリン500mg/lに加え、硝酸銀5mg/l、また選抜用としてカナマイシン5-30mg/l（ナカライテスク社、カナマイシン硫酸塩）を添加した培地で14日-21日培養した。このとき緑色のカルスが出現する場合があるので、それらは速やかに次のステップの培地に植え替えた。

#### 【0153】

次のステップの培地としては例えばMS培地（シグマ社、M5519）+スクロース1%+ベンジルアミノプリン3mg/l+ゼアチン1mg/l+カーベニシリン500mg/l+カナマイシン5~30mg/lを含む選抜培地がある。切り口からカルス形成した胚軸をこの培地に移植し23℃で3週間培養し、その後緑のカルスが出現するまで3週間後ごとに3~5回移植を繰り返した。

#### 【0154】

緑のカルスは、見つけ次第胚軸から切り取り同じ組成の培地に移した。その後、緑色の部分だけを切り取って植えついで行くと1~30%の確率で不定芽が形成された。不定芽はその後B5基本培地（シグマ社、G5893）+スクロース3%+ベンジルアミノプリン1mg/lに移して育成したあとMS培地（シグマ社 M5519）+スクロース3%+ナフタレン酸0.1mg/l+ベンジルアミノプリン0.01mg/lを含む培地で発根させた。

#### 【0155】

実施例7：形質転換体の解析（導入DNAの検出）

実施例6により得られた、つぼみを形成した形質転換体の1個体から葉を1枚取りキアゲン社のDNA単離キット（DNeasy plant mini）を用いてDNAを単離した。

PCR法を用いて、導入DNA断片の3カ所(a, b, c部位)について、検出した（結果を図3に示す）。a部位は配列番号1の塩基配列3186bpから3753bpまでの568bpであり、フォワードプライマーとして「5'-GAAGCAAAAAAGAAAACGAGCAGAG-3'

」(配列番号4)、リバープライマーとして「5'-CCAAAAATCCGAAATCCGAATAGAC-3'」(配列番号5)を使用した。b部位は配列番号1の塩基配列4869bpから5112bpまでの244bpであり、フォワードプライマーとして「5'-CTCGGCTCTGGGTTTAGTGA-3'」(配列番号6)、リバープライマーとして「5'-TCCACAAACCCTAGCCAACA-3'」(配列番号7)を使用した。c部位は配列番号1の塩基配列7766bpから8250bpまでの485bpであり、フォワードプライマーとして「5'-GCTTATGCTTCTCTGGTTCGCC TC-3'」(配列番号8)、リバープライマーとして「5'-CTCAGTTTTTCGTCACCTTAC ACAATGC-3'」(配列番号9)を使用した。

#### 【0156】

1 $\mu$ lの形質転換体DNA溶液(50ng/ $\mu$ l)に、12.1 $\mu$ lの滅菌水、2 $\mu$ lの10x PCR 緩衝液(100mM Tris-HCl(pH8.3), 500mM KCl)、1.2 $\mu$ lの25mM MgCl<sub>2</sub>、1.6 $\mu$ lの2.5mM dNTP mix、1 $\mu$ lの各部位の10 $\mu$ Mフォワードプライマー溶液、1 $\mu$ lの各部位の10 $\mu$ Mリバープライマー溶液、0.1 $\mu$ lの5 unit/ $\mu$ lのrTaq DNA polymerase(宝酒造社製)を加えて混和後、94℃40秒、55℃30秒、72℃1分のサイクルを35回繰り返す事によりDNAを増幅した。サーマルサイクラーは、UNO1 I(Biometra社製)を使用した。反応終了後、4% Nusive3:1 Agarose(FMC社製)/1 $\times$ TBE(89mM Tris-borate, 89mM boric acid, 2mM EDTA)緩衝液のゲル電気泳動により、増幅産物を確認した(図3を参照)。

#### 【0157】

その結果、a部位はこの形質転換ナタネには導入されていないことがわかった。残りの2カ所(b,c部位)は、ポジティブコントロールと同じ大きさの増幅産物が得られ、形質転換ナタネに当該DNAが組み込まれていることが確認された。

#### 【0158】

実施例8:形質転換体の解析(cms原因タンパク質ORF125蓄積量の減少の確認)

実施例7と同じ個体のつぼみを1つ取り、CMSタンパクであるORF125の蓄積量の減少をウエスタンブロッティング法によって解析した。結果を図4に示す。

## 【0159】

## (1) 形質転換個体からのタンパク質抽出

タンパク質の抽出法、ウエスタンブローディング法に関して、N. Koizukaら (The or Appl Genet (2000)100:949-955) の方法に準じて行った。

具体的には、得られた形質転換ナタネのつぼみ（長さ1mm）1つと、100 $\mu$ lの氷冷したタンパク質抽出緩衝液（50mM Tris-HCl (pH7.5), 2%(W/V) SDS）を氷冷した乳鉢に入れ、乳棒で磨り潰した。この液を、マイクロ遠心チューブに移し、15000rpm, 15分間、4℃で遠心した。遠心後、上澄み液を新しいマイクロ遠心チューブに移し、100℃で5分間加熱した。再度15000rpm, 15分間、4℃で遠心し、上澄み液を新しいマイクロ遠心チューブに移し、SDS可溶性タンパク質溶液とした。ブラッドフォード法によるタンパク質定量キット（Bio-rad社製）を用いてSDS可溶性タンパク質溶液の濃度を測定した。これと平行して、細胞質雄性不稔系統のナタネと稔性回復系統のナタネのつぼみからも同様にSDS可溶性タンパク質溶液を抽出、濃度測定を行った。

## 【0160】

## (2) SDS-PAGE法によるタンパク質の分離とPVDF膜への転写：ウエスタンブローディング

7x10cm角の10%のSDSポリアクリルアミドゲルを用いて、1レーンあたり15 $\mu$ gのSDS可溶性タンパク質を乗せて電気泳動にて分離した。加えて、ORF125タンパク質蓄積量の比較のため、細胞質雄性不稔系統のナタネの希釈系列も同様に乗せて分離した。電気泳動条件は10mAで1時間、15mAで1時間行った。電気泳動後、セミドライブローディング装置（日本泳動社製）を用いて、PVDF膜（ミリポア社製）にポリアクリルアミドゲル中のタンパク質を、100mA, 1時間の条件で転写した。

## 【0161】

## (3) 抗体を用いたタンパク質の検出：ウエスタンブローディング

タンパク質を転写したPVDF膜を、上下2枚に分割し、10mlのブロッキング溶液（20mM Tris-HCl (pH7.5), 500mM NaCl, 0.05% Tween20, 5%スキムミルク）に移し、1時間振とうして、ブロッキングした。上のPVDF膜でミトコンドリアタンパ

ク質量のコントロールとしてATPAを、下のPVDF膜で細胞質雄性不稔関連タンパク質であるORF125をそれぞれ検出した。10mlの1次抗体反応液（10mlのブロッキング溶液に、ATPA検出用として100 $\mu$ lのATPAモノクローナル抗体を加え、ORF125検出用として2 $\mu$ lのORF125に対するウサギ抗血清を加えた(M. Iwabuchi et al. Plant Molecular Biology (1999)39:183-188)) に、PVDF膜を移し18時間振とうした。100mlのTTBS (20mM Tris-HCl(pH7.5), 500mM NaCl, 0.05% Tween20) にPVDF膜を移し、10分間振とうした。この操作を3回繰り返し過剰の一次抗体液を洗い流した。10mlの2次抗体反応液（10mlのブロッキング溶液に、ATPA検出用として10 $\mu$ lのパーオキシダーゼを付加したヤギ抗マウスIgG (Amersham社製)、ORF125検出用として10 $\mu$ lのアルカリフォスファターゼを付加したヤギ抗ウサギIgG (Bio-rad社製)を加えた(M. Iwabuchi et al. Plant Molecular Biology (1999)39:183-188)) に、PVDF膜を移しそれぞれ1時間振とうした。100mlのTTBS (20mM Tris-HCl(pH7.5), 500mM NaCl, 0.05% Tween20) にPVDF膜を移し、10分間振とうした。この操作を3回繰り返し過剰の2次抗体液を洗い流した。ATPA検出用として、パーオキシダーゼに対する化学発光システム「ECL+」(Amersham社製)を用い、5秒間露光検出した。ORF125検出用として、アルカリフォスファターゼの発色基質であるBCIP/NBT (MOSS Inc.社製)を用い、5分間発色検出した。

#### 【0162】

その結果、2系統の細胞質雄性不稔ナタネのつぼみ、稔性回復ナタネ、細胞質雄性不稔系統に当該DNAが挿入された形質転換体ナタネのつぼみでは、コントロールであるATPAの蓄積量はほとんど変化しないが、ORF125タンパク質の蓄積量は形質転換体ナタネで優位に減少していることが示された。この減少の度合いは、細胞質雄性不稔系統に交配によって稔性回復遺伝子が導入された稔性回復系統と同等である(図4、及びM. Iwabuchi et al. Plant Molecular Biology (1999)39:183-188)。また、ORF125タンパク質蓄積量の減少の度合いを希釈系列と比較すると、稔性回復ナタネで1/8~1/16、形質転換ナタネで1/8程度であることが解った。以上、先に述べたようにナタネでは稔性が回復する事とORF125タンパク質の蓄積量が減少する事とは、強く連鎖し、同意の関係にあ



ることから、当該DNA配列は、ミトコンドリア内のORF125タンパク質蓄積量を減少させる働きがあり、稔性回復遺伝子を保持したゲノムDNA配列であることが証明された。

さらに開花体から葯を取り出し、顕微鏡観察したところ、正常な花粉が形成されていることが確認できた(図5)。

#### 【0163】

##### 実施例9：cDNAの単離

cDNAの単離は、RNA供与体として、遺伝子地図を作製したときに用いたF<sub>2</sub>集団よりRf1遺伝子をホモに持つ花粉稔性のあるF<sub>2</sub>個体を選び、つぼみからmRNAを精製した後、cDNAを合成後、5'-RACEまたは3'-RACE法を用いて行った。

(mRNAの精製)

Rf1遺伝子をホモに持つ花粉稔性のあるF<sub>2</sub>個体のつぼみから、常法であるグアニジウムチオシアネート法により、RNeasyキット(Qiagen社)を用いて、全RNAを抽出した。全RNAからPolyA+RNAを、Origo(dT)セルロースカラムを用いた「mRNA Purification kit」(Amersham Pharmacia社)を用いて精製しmRNAとした。

#### 【0164】

(5'-RACEと3'-RACEによるcDNAの単離)

精製したmRNA・1 $\mu$ gを用いて、5'-RACEと3'-RACE法による「Marathon RACE system 5'RACE 3'RACE」キットを用いてcDNAを単離した。遺伝子特異的プライマーとして5'-RACEには5'-GATTCCTTTCTCTTGCATTTTCAG-3'(配列番号10)を使用し、3'-RACEには、5'-ATCTCGTCCTTTACCTTCTGTGG-3'(配列番号11)を使用した。得られたクローンの塩基配列を確定後、cDNA配列を得た(配列番号2)。

#### 【0165】

##### 実施例10：cDNAのアミノ酸配列への変換と解析

(1) cDNAのアミノ酸配列への変換は、通常のジェネティックコードを用いて、遺伝子解析ソフト「Genetyx-SV」(ソフトウェア開発(株))を用いて行い、配列番号3に記載のアミノ酸配列を得た。PPRモチーフの解析は、Protein families database of alignments and HMMs(以下Pfamと略 <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>)にあるプログラムで行った。解析の結果、配列

番号 1 に示した稔性回復遺伝子の翻訳産物は 16 個の PPR モチーフを持つタンパク質である事を見出した。また PPR モチーフは、3 つの PPR クラスターとなっていた。その 3 つとは、

- ① PPR クラスター # 1 : N 末端から 1 番目の PPR モチーフから 5 番目の PPR モチーフが連続した 175 残基からなる PPR クラスター、
  - ② PPR クラスター # 2 : N 末端から 6 番目の PPR モチーフから 12 番目の PPR モチーフが連続した 245 残基からなる PPR クラスター、並びに
  - ③ PPR クラスター # 3 : N 末端から 13 番目の PPR モチーフから 16 番目の PPR モチーフが連続した 140 残基からなる PPR クラスター、
- であった。

【0166】

実施例 11 : 本発明のタンパク質の解析

コセナ細胞質雄性不稔を引き起こす原因タンパク質 ORF 125 の遺伝子の転写産物 (mRNA) に結合することで大腸菌において翻訳阻害を起こすかどうかの実験を行った。

配列番号 2 に示した稔性回復遺伝子を実験ベクター pQE-80L (Qiagen 社) の BamHI-SphI 部位に導入し、6 個のヒスチジン残基が (6XHis) N 末端に付加する実験ベクターを構築した (pQEB1/cds6)。また、pSTV29 (宝酒造) ベクターを鋳型として、BamHI 部位を導入するプライマー : CGGGATCCGCTCACAATT (配列番号 12) と、M13 プライマー RV (宝酒造 (株)) を用いて DNA を増幅した。DNA の増幅は、Takara LA PCR Kit (宝酒造 (株)) を用いた。増幅した DNA を、制限酵素 BamHI、EcoRI (宝酒造 (株)) で切断後、Suprec-02 (宝酒造 (株)) を用いて精製した。orf125 遺伝子の 5'-UTR 領域と orf125 の 25 アミノ酸の両端に BamHI と EcoRI 部位を有する DNA 断片を合成するために、2 本のプライマーを用いて、藤本の方法 (植物の PCR 実験プロトコル : 合成 DNA の実際 PP84-87 (秀潤社)) に従って、PCR を行った。プライマーは、

125-5' BamHI :

GCGGATCCCAATTTTCATTCTGCATCACTCTCCCTGTCGTTATCGACCTCGCAAGGTTTTTGAACGGCCGAA  
ACGGGAAGTGACAATACCGCTTTTCTTC (配列番号 13)

125-5' EcoRI :

GGAATTCACCTAACTTTACATTCAGTAGGAGTGAGATTATGACAAAAAGTGGACAATTTTTTCGAAAAAGGTAA  
TCATGCATTTATATGCTGAAGAAAAGCG (配列番号 14)

の2本を用いた。増幅したDNAを、制限酵素BamHI、EcoRI (宝酒造 (株)) で切断後、Suprec-02 (宝酒造 (株)) を用いて精製した。精製したDNAはTaKaRa Ligation kit (宝酒造 (株)) を用いて結合させ、大腸菌DH10B (Gibco BRL社製) に形質転換した。50  $\mu$ g/mlのクロラムフェニコール (Sigma社製) を加えたLB寒天培地 (1% Bacto-Tryptone, 0.5% Bacto-Yeast Extract, 1% NaCl, 1.5% Bacto-Agar, 0.1mM IPTG, 20  $\mu$ g/ml X-Gal) にて、18時間以上37℃で培養した。薄く青いコロニーから、定法によりプラスミドを抽出し塩基配列を確認した。この様にして、EcoRI部位からlacZ遺伝子の転写開始点の間にorf125遺伝子の5'-UTR領域とorf125の25アミノ酸を含む174bp (図6に記載の塩基配列のうち、7~180番目) を導入したベクターを構築した (pSTV125-5' #LA6)。また同時に該174bpに相当する部分に数箇所に変異を起こさせた断片 (図6に記載の塩基配列の7~183番目) を持つベクターが得られた (pSTV125-5' #LA12)。

#### 【0167】

該ベクターpSTV125-5' #LA6及び#LA12をそれぞれ、大腸菌DH10B (GibcoBRL社) に導入し、LB培地に50  $\mu$ g/mlのクロラムフェニコール (和光純薬社)、200  $\mu$ MのIPTG (和光純薬社)、40  $\mu$ g/mlのX-Gal (宝酒造社) を加えた寒天培地で、37℃一晚静地培養し、コロニーを生育させたところ、薄く青色になった。すなわち、いずれのベクターを導入した大腸菌においても導入されたLacZ遺伝子が発現したことが認められた。

#### 【0168】

さらに、上述のpSTV125-5' ベクターとpQEB1/cds6ベクターとを共に上記と同様の大腸菌に導入するために、上記培地に50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを加えた培地を用いて培養したところ、pSTV125-5' #LA6と共存させた場合は、コロニーが白くなったが、導入断片部位に変異を有するpSTV125-5' #LA12と共存させた場合は、コロニーが薄く青くなり、青さの程度は#LA12単独の場合と変わり無かった。尚、導入したこれらのベクターが大腸菌から欠落していないかについては、それぞれ

のコロニーを培養後、常法によりベクターを抽出することで確認した。

#### 【0169】

以上の結果より、pQEB1/cds6ベクターにより大腸菌内で発現したタンパク質は、pSTV125-5' #LA6のmRNAと結合した結果、LacZ遺伝子の発現が抑えられ白いコロニーになったと考えられる。また、pSTV125-5' #LA12と共存させた場合には、導入断片部位に変異を有することによりpQEB1/cds6由来のタンパク質がmRNAに結合することが出来ず、その結果LacZ遺伝子が発現し青色になったと考えられる。

#### 【0170】

このことから、配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質はorf125のmRNA、より具体的には、少なくともorf125-5'UTR領域とORF125の25アミノ酸残基のコード領域の転写産物に関与して、ORF125タンパク質の発現を抑えているものと推察される。

#### 【0171】

すなわち、本発明の遺伝子の翻訳産物は、ミトコンドリアに移送された後に、該ミトコンドリア内で、雄性不稔遺伝子と結合し、翻訳を阻害することで、細胞質雄性不稔の原因タンパク質の蓄積量を減少させることにより、細胞質雄性不稔性を可稔に回復していることが推察される。

#### 【0172】

##### 【発明の効果】

本発明により、Rf遺伝子、特には、ダイコン由来のRf1遺伝子が単離され、その構造が同定された。さらに、本発明によれば、単離したRf遺伝子を利用してナタネ回復系統を確立する手段を提供することが可能になった。

#### 【0173】

##### 【配列表】

##### SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Chemical Corporation

<120> A protein which is involved in recovery of cytoplasm male fertility from sterility and a gene encoding the protein

<130> A21005A

<160> 14

【 0 1 7 4 】

<210> 1

<211> 8553

<212> DNA

<213> Raphanus sativus

<400> 1

atttaaattt tataacttaat atgtatttaa actctccaat gcaataaggg atataaacia 60  
aaggtattca tagatgttat gtattcgtag accgatgtat tcgtatacct taaatatatg 120  
tatacttatg tatacatata cttgtgtatt cgtacacctt aagtattcga tgggttatgt 180  
tgggtattcgt atattttatg tatttgtaca cttatgtat acttatgtat atgtacacct 240  
tatgtatttg tacatcttaa gtattagatg agttatgttg atattcgtag acctatgta 300  
ttcgtacacc ttctgtatac cttaggattt cgtacacctt aggtatttgt acacctaagg 360  
tattcgtaca cttatgtat acttatgtat acgtacacct tatatattcg aacaccttag 420  
atattcgtac atcttatgta tacgtatact tatttcttga gttatagtga attagattgt 480  
attaaacgtt agacataggg ttccggattt atccaagggt tccagattgt tttagattct 540  
ggatttacc aatggttctg gatttacc aagggttccgg atttaggatt caaggtttag 600  
agtttaggat tttaggttta gtgttttgtt gatgattttt aatatttaag ataatgtag 660  
acaaatttgt tcttctacc attttgacaa aaaatgaaag atctatgtag gtttccaagt 720  
ttattaaatt taccagatt tatgaaaatt atccataaat ttatataatt ttatgaataa 780  
tttatcattt atttgggtaa atttcataaa tatgaaagtt tcttttatgg gtcaaaatgt 840  
ataatttatt cggattctgg atttaccaa ggggtccgga ttacccaag gattccagat 900  
ttaggattca tggtttagag tttaggagtt tatgtttagt gttttgttga tgattttaaa 960  
tatttaagat aagaagtta tgcgagagaa tttgggtcaa ctcaggttga gtcttaactt 1020  
cttaagacat aaaaatcact agatacttga catggaggca ccaaattatc ctatattttt 1080  
tggacttaat cttggtgtac ccctagagta aaccttaagg ttcaccaacc aatagaaatc 1140  
actcatttca cagttgatat cttttaaaaa agtaaacaaa atattgtcga gttatattac 1200  
atttttaaaa taaaatatt aaaaaataaa aataataata tatgcaaaaa aaaagatttt 1260  
ttaaaaagat ttaatttcg tcaacaaaac actaaactct aaactctaaa tcttaaaccc 1320

ttggataaat actaaaccct aaattaaaaa cattaaacca taatagtatt ttttaagattt 1380  
aatgttttag tgttttagtgt ttttgattta gaatttagga ttatccaagt gtttatgatt 1440  
tatccaaggg tttagggttt agaatttagg gtttaggggt tagagtttaa aattatccaa 1500  
gggtctaggg tataaccaag ggtttagggt ttaggattta gggtttaggg tttagaattt 1560  
agggttttag gtttagagtt taaaattatc caagggttta gggatatccc aagggttttag 1620  
ggtttaggat ttagggttta aggttttagtg ttttttgacg atattaaaaa tagttttcaa 1680  
aaattcattt tttgtaacgg ctattatttt ttttttatat tttatttatt ttaaaaacat 1740  
aatataactt gacaatattt tcttttcttt ttaaaaaaaa tattaattat gaaataacttg 1800  
attcctattg gttgggtgaa cctaaatgtt cactctaggg gtgaacctaa ggataactct 1860  
attttttggg gtgaaatagc actatagcgg atatcttttt caatagatta taagcacggc 1920  
tctacctatg actaatcaag aacttgggat gattggaaat ctgcagggtg tactcaatat 1980  
gggattatat tggttctaac aagtagatat gatccttgaa aattaaagt attagatcag 2040  
ttcatcgtga aaggtgtagg gttgtcatt ttattaacaa atttgtcatt tcattaacaa 2100  
tttttgtcat ttataaaca tgaaaattat aacgaatgca ctttgctgcc agatcccaat 2160  
ttgtcatttt atttttggga aaaaaatgta gcatttcgtg agtgtttcta tttttggcaa 2220  
aaacaaaaag tgtgagatca attttgacca aaaaaaatg taagattcac gtaggtttcc 2280  
aaatttatta aatttaccca actatattaa aattaaatgt agacaaattt gttttcctgc 2340  
cattttggca aaaaatgaag gatctatgaa ggtttccaag tttattaaat ttactcagat 2400  
ttatgataat tatccataaa tttacataat tttatgaatt atcatttatt tgggtagatt 2460  
tcataaatat gaaagtttct tttatgagtc aaaatgtata atttattggg taactttcat 2520  
aaattttaga atttacctg attttatatt aattcgtata gatttatgtt gactttatat 2580  
atgaaaaaat atgtattata ttaaaagtag ttgctcatat atgattttta aatattaaat 2640  
atgatccaaa agtttaatga ataaagaatg tttatggaat ttacaaaagt tagttgttaa 2700  
aagttagtgg gaaaaaatt attttttata ggcaaagtgg attttgggtc ccacgaaatt 2760  
acttttccaa cttgccaagt ttaataggca aaaagggtta aatgtcata aattttattct 2820  
ctcttacta ggttgcccaa ttgcctaata taaacttgag gtggcctatt tttctaattc 2880  
aaacttaaaa gttgcccttt cccctaattg acccataaaa gaatgaaaga catttttctt 2940  
ttccaaatta caatccctag ataattttat tttgtaggtg cattccatcg gttatgatta 3000  
cagaatagct acgtttctct attgattctt attgcgccgt tggtgacgtt ttccatggaa 3060

tcaagtagtg ttttatctcc tactactaac aacatattca tagattttgt ttatcacttg 3120  
ttctgtgttc ctgatcatat acttgactca gtttctgtga tttcatcaag tttttgagaa 3180  
cagaagaagc aaaaaagaaa acgagcagag ctgctcttac aatgttttaa ccgtgagtga 3240  
taaatttatt tacataaaag tattttaaaa atagatttaa tcaaccaatt taatatatta 3300  
ttttatattt agttcatttt tttttgacat cttttatatt tagtttagaa cacctctatt 3360  
tgagtacaac atagattata atgataaatt tataaaatag cataattttt tattttcatt 3420  
gttttatgat aaaattctaa ataacaataa ttataatatt attatattac taattgcaaa 3480  
aattaattaa tacattattt tataataaat atttaaaacg ttgggtagga ttttgtaga 3540  
tttttttcaa caaattttgt tatagctaaa ataaaattca aatgtattgt taaaattgat 3600  
tttttttttt ttgattattt aagatttaaat ataaataaac atatatgtca tattaaatat 3660  
ttaactaagt ggtcctaatac tttgaactag ggggtggcgt tcgggtacct attcgggttt 3720  
cggttcgagt ctattcggat ttcggatttt tggggtcaaa gattttagcc ccattcgggt 3780  
atttctaaat tacggttcgg gttcggttcg gatccttgcg gattcggttc gggttcggat 3840  
aaccggtta aattattttc aaaattttta aatttcatta tatattttta acttttcgaa 3900  
atttgtaaac aaaataatat attacatata aatttcaata atatgtgtcg aagtacaaaa 3960  
acttaacatg taaattgggt tgatttggat atttggatag aaaatcaatc atattttata 4020  
tatttttggg gttttgagta tgctttaact atttatacat gtacttttta atgtttttat 4080  
atattttcta gtattttgaa caatttaaaa gtattatata tattttagat gctttttaat 4140  
atatattcaa tctaaaaata gttaaataa tatgtatatt aatctatttc ggatacattc 4200  
ggatatccaa aatatttttg ttcggatcgg gttcggtttt ggttctttta ataccaaaaa 4260  
tttaaaccta ttcggatatt caattaattt cggttcggat ttggtattac ttttgcagat 4320  
cggattcggg tcggttcttt ggattcagtt tttttgtcca gccctactct gaacagtaga 4380  
taaaaaatag aaccctaaat taataggtta gattttgggt aggtctttct aattagtatg 4440  
gagattctcg attccttctc attgcagtggt ggtatgtcca actcattgtt tatgtacata 4500  
tccaatttag ttttgagtca aatgtttagt tacttaagag ttgaatgaaa taggggatga 4560  
tattgatggc caaggttctc ccaaagtaaa taactttgtt tatattttta gttagcttat 4620  
aacatcaata aaaatgtcat taactgggtc aataaaaatg tcattaactg gttcctctaa 4680  
tataattatt taacacacct ggctgttgat aaatttttat gatcgtttaa taattttaga 4740  
agtggatagt ctgtaaagtg tctttgattg gtcgtcttga tttttaaag tggactaaac 4800

aagaaggctt agtaataaat actgaaccgg aactctactg gtttcaatag ctcggtttat 4860  
caatttctct cggctctggg tttagtgaat catgtggccc tgtgggttta aacaaggaac 4920  
tcaatcaatc aactggtgac aaatctgaac cggaattgt ataattcaaa ctgaaccggt 4980  
tcttgtaaaa caaatggaac cggtttgtag tttatctctc gtttattttc tcagtcacga 5040  
gtttttttta gagatcgacg aagaacaaaa tttaggcgaa acaaaaataa aatgttggct 5100  
agggtttgtg gattcaagtg ttcttcttct cctgctgagt ctgcggctag attgttctgt 5160  
acgagatcga ttcgtgatac tctggccaag gcaagcggag agagtgcga agcaggtttt 5220  
ggaggagaga gtttgaagct gcaaagtggg tttcatgaaa tcaaaggttt agaggatgcg 5280  
attgatttgt tcagtgcacat gcttcgatct cgtcctttac cttctgtggt tgatttctgt 5340  
aaattgatgg gtgtgggtgg gagaatggaa cgcccggatc ttgtgatttc tctctatcag 5400  
aagatggaaa ggaaacagat tcgatgtgat atatacagct tcaatattct gataaaatgt 5460  
ttctgcagct gctctaagct cccctttgct ttgtctacat ttggtaagat caccaagctt 5520  
ggactccacc ctgatgttgt taccttcacc accctgctcc atggattatg tgtggaagat 5580  
agggtttctg aagccttga tttttttcat caaatgtttg aaacgacatg taggccaat 5640  
gtcgtaacct tcaccacttt gatgaacggg ctttgccgag agggtagaat tgtcgaagcc 5700  
gtagctctgc ttgatcggat gatggaagat ggtctccagc ctaccagat tacttatgga 5760  
acaatcgtag atgggatgtg taagaaggga gatactgtgt ctgcactgaa tctgctgagg 5820  
aagatggagg aggtgagcca catcataccc aatgttgtaa tctatagtgc aatcattgat 5880  
agcctttgta aagacggacg tcatagcgat gcacaaaatc ttttactga aatgcaagag 5940  
aaaggaatct ttcccgattt atttacctac aacagtatga tagttggttt ttgtagctct 6000  
ggtagatgga gcgacgcgga gcagttgttg caagaaatgt tagaaaggaa gatcagccct 6060  
gatgttgtaa cttataatgc tttgatcaat gcatttgcag aggaaggcaa gttctttgag 6120  
gctgaagaat tatacgatga gatgcttcca aggggtataa tccctaatac aatcacatat 6180  
agttcaatga tcgatggatt ttgcaaacag aatcgtcttg atgctgctga gcacatgttt 6240  
tatttgatgg ctaccaaggg ctgctctccc aacctaatca ctttcaatac tctcatagac 6300  
ggatattgtg gggctaagag gatagatgat ggaatggaac ttctccatga gatgactgaa 6360  
acaggattag ttgctgacac aactacttac aacactctta ttcacgggtt ctatctggtg 6420  
ggcgatctta atgctgctct agacctttta caagagatga tctctagtgg tttgtgccct 6480  
gatatcgtaa cttgtgacac tttgctggat ggtctctgcg ataatgggaa actaaaagat 6540



gcattggaag tgtttaaggt tatgcagaag agtaagaagg atcttgatgc tagtcacccc 6600  
ttcaatgggtg tggaacctga tgttcaaact tacaatatat tgatcagcgg cttgatcaat 6660  
gaagggaagt ttttagaggc cgaggaatta tacgaggaga tgccccacag ggggtatagtc 6720  
ccagatacta tcacctatag ctcaatgatc gatggattat gcaagcagag ccgcctagat 6780  
gaggctacac aaatgtttga ttcgatgggt agcaagagct tctctccaaa cgtagtgacc 6840  
tttactacac tcattaatgg ctactgtaag gcaggaaggg ttgatgatgg gctggagctt 6900  
ttctgcgaga tgggtcgaag agggatagtt gctaacgcaa ttacttacat cactttgatt 6960  
tgtggttttc gttaaagtggg taatattaat ggggctctag acattttcca ggagatgatt 7020  
tcaagtgggtg tgtatcctga taccattacc atccgcaata tgctgactgg tttatggagt 7080  
aaagaggaac taaaaagggc agtggcaatg cttgagaaac tgcagatgag tatggtatgt 7140  
aagtttctgt tcagtctatg tattttttat ataaacaaga atgtatacat tcttttgtgt 7200  
gtagcttcag attgatgata cacgttctgg aattaacat tggtttgggt ttgcattgta 7260  
ggatctatca tttgggggat gaatgatcaa agattttctt ctgtttgcgc agcagagctt 7320  
caatgtcatt ttgtttctgc tgctgcatgt ataccctact aatgtttgat caaatcgttg 7380  
aatagagtga tcatagtga aaattgtgtg gttagtaagt tattttgctg ctattctaatt 7440  
gacagccttt tatgcgtcta ttgtctgggc ttaataaatt tgaccatttc caattaaatt 7500  
ccatacactt gtttcacgca agattattgg tctgaactaa agaggcacac cttccagaag 7560  
atttcagggtg ttaaaagatg tttaggtgtc tgcccgttct gtagctgtca ccatggttat 7620  
cgtcaagctc ggtcttcatg agagctgata gctgtgatgc catcttctc ctcttcttca 7680  
tattggctct gtctgcctt gtctgctccc atgtgggttc aggaggagat catgttcttt 7740  
taatcttgggt ggaaatgttg ttgtcgctta tgcttctctg gttcgctctt tgacttgctt 7800  
agcttcattc tttatctcca aattgctatg aaatcaattt accataagta gaataaactt 7860  
gcagattcat tctattattg cttaaagctt tgttaatcaa caaagaaacc agagacgaga 7920  
aatacaaaact ctataagctt ctcttttttc tttcttgata gtaaaaccgg ttagagagta 7980  
gagattgatc atatgaacta aaaatcgata ctaaaacggg ttggctccga cttataaacc 8040  
ggaacccac cgttttgcat ctctctctca aacatcacac aatgtccaag atgaagaagt 8100  
atttgtgttg tcatctctct ggggtgaggag atgcaaagt tatattctaa ttgttttcag 8160  
tgcttgggtc aactttttta agagattact cccagtgggt ggatcaaaga aagagtcaac 8220  
attgcattgt gtaaggtgac gaaaactgag ttaaagtaag tgagaacaat acttcaatgc 8280

ttttcttggtg acaacctgtg taatcatcgc atttgaatat atatgtatat gatgcttatg 8340  
 atgaagctat gagaataggc aaatagggtc tgtgttattt ccctgcgatt ctagattctg 8400  
 atttgTTTT ctttcttaat atttagatta ggtgggtcttg cttatcctgt tttagtatta 8460  
 gagtcggagt tttggggatg aatcatcccg gatgatatat acaattgtgt attttatgaa 8520  
 tttcagtttt tagtggataa tgaacacgtt aac 8553

【 0 1 7 5 】

<210> 2

<211> 2064

<212> DNA

<213> Raphanus sativus

<400> 2

atg ttg gct agg gtt tgt gga ttc aag tgt tct tct tct cct gct gag 48  
 Met Leu Ala Arg Val Cys Gly Phe Lys Cys Ser Ser Ser Pro Ala Glu

1 5 10 15

tct gcg gct aga ttg ttc tgt acg aga tcg att cgt gat act ctg gcc 96  
 Ser Ala Ala Arg Leu Phe Cys Thr Arg Ser Ile Arg Asp Thr Leu Ala

20 25 30

aag gca agc gga gag agt tgc gaa gca ggt ttt gga gga gag agt ttg  
 Lys Ala Ser Gly Glu Ser Cys Glu Ala Gly Phe Gly Gly Glu Ser Leu

35 40 45

aag ctg caa agt ggg ttt cat gaa atc aaa ggt tta gag gat gcg att  
 Lys Leu Gln Ser Gly Phe His Glu Ile Lys Gly Leu Glu Asp Ala Ile

50 55 60

gat ttg ttc agt gac atg ctt cga tct cgt cct tta cct tct gtg gtt 240  
 Asp Leu Phe Ser Asp Met Leu Arg Ser Arg Pro Leu Pro Ser Val Val

65 70 75 80

gat ttc tgt aaa ttg atg ggt gtg gtg gtg aga atg gaa cgc ccg gat  
 Asp Phe Cys Lys Leu Met Gly Val Val Val Arg Met Glu Arg Pro Asp

85 90 95

ctt gtg att tct ctc tat cag aag atg gaa agg aaa cag att cga tgt  
 Leu Val Ile Ser Leu Tyr Gln Lys Met Glu Arg Lys Gln Ile Arg Cys  
 100 105 110  
 gat ata tac agc ttc aat att ctg ata aaa tgt ttc tgc agc tgc tct  
 Asp Ile Tyr Ser Phe Asn Ile Leu Ile Lys Cys Phe Cys Ser Cys Ser  
 115 120 125  
 aag ctc ccc ttt gct ttg tct aca ttt ggt aag atc acc aag ctt gga  
 Lys Leu Pro Phe Ala Leu Ser Thr Phe Gly Lys Ile Thr Lys Leu Gly  
 130 135 140  
 ctc cac cct gat gtt gtt acc ttc acc acc ctg ctc cat gga tta tgt 480  
 Leu His Pro Asp Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Leu His Gly Leu Cys  
 145 150 155 160  
 gtg gaa gat agg gtt tct gaa gcc ttg gat ttt ttt cat caa atg ttt  
 Val Glu Asp Arg Val Ser Glu Ala Leu Asp Phe Phe His Gln Met Phe  
 165 170 175  
 gaa acg aca tgt agg ccc aat gtc gta acc ttc acc act ttg atg aac  
 Glu Thr Thr Cys Arg Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Met Asn  
 180 185 190  
 ggt ctt tgc cgc gag ggt aga att gtc gaa gcc gta gct ctg ctt gat  
 Gly Leu Cys Arg Glu Gly Arg Ile Val Glu Ala Val Ala Leu Leu Asp  
 195 200 205  
 cgg atg atg gaa gat ggt ctc cag cct acc cag att act tat gga aca  
 Arg Met Met Glu Asp Gly Leu Gln Pro Thr Gln Ile Thr Tyr Gly Thr  
 210 215 220  
 atc gta gat ggg atg tgt aag aag gga gat act gtg tct gca ctg aat 720  
 Ile Val Asp Gly Met Cys Lys Lys Gly Asp Thr Val Ser Ala Leu Asn  
 225 230 235 240  
 ctg ctg agg aag atg gag gag gtg agc cac atc ata ccc aat gtt gta  
 Leu Leu Arg Lys Met Glu Glu Val Ser His Ile Ile Pro Asn Val Val

245 250 255  
atc tat agt gca atc att gat agc ctt tgt aaa gac gga cgt cat agc  
Ile Tyr Ser Ala Ile Ile Asp Ser Leu Cys Lys Asp Gly Arg His Ser  
260 265 270  
gat gca caa aat ctt ttc act gaa atg caa gag aaa gga atc ttt ccc  
Asp Ala Gln Asn Leu Phe Thr Glu Met Gln Glu Lys Gly Ile Phe Pro  
275 280 285  
gat tta ttt acc tac aac agt atg ata gtt ggt ttt tgt agc tct ggt  
Asp Leu Phe Thr Tyr Asn Ser Met Ile Val Gly Phe Cys Ser Ser Gly  
290 295 300  
aga tgg agc gac gcg gag cag ttg ttg caa gaa atg tta gaa agg aag 960  
Arg Trp Ser Asp Ala Glu Gln Leu Leu Gln Glu Met Leu Glu Arg Lys  
305 310 315 320  
atc agc cct gat gtt gta act tat aat gct ttg atc aat gca ttt gtc  
Ile Ser Pro Asp Val Val Thr Tyr Asn Ala Leu Ile Asn Ala Phe Val  
325 330 335  
aag gaa ggc aag ttc ttt gag gct gaa gaa tta tac gat gag atg ctt  
Lys Glu Gly Lys Phe Phe Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Asp Glu Met Leu  
340 345 350  
cca agg ggt ata atc cct aat aca atc aca tat agt tca atg atc gat  
Pro Arg Gly Ile Ile Pro Asn Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp  
355 360 365  
gga ttt tgc aaa cag aat cgt ctt gat gct gct gag cac atg ttt tat  
Gly Phe Cys Lys Gln Asn Arg Leu Asp Ala Ala Glu His Met Phe Tyr  
370 375 380  
ttg atg gct acc aag ggc tgc tct ccc aac cta atc act ttc aat act 1200  
Leu Met Ala Thr Lys Gly Cys Ser Pro Asn Leu Ile Thr Phe Asn Thr  
385 390 395 400  
ctc ata gac gga tat tgt ggg gct aag agg ata gat gat gga atg gaa

Leu Ile Asp Gly Tyr Cys Gly Ala Lys Arg Ile Asp Asp Gly Met Glu  
405 410 415  
ctt ctc cat gag atg act gaa aca gga tta gtt gct gac aca act act  
Leu Leu His Glu Met Thr Glu Thr Gly Leu Val Ala Asp Thr Thr Thr  
420 425 430  
tac aac act ctt att cac ggg ttc tat ctg gtg ggc gat ctt aat gct  
Tyr Asn Thr Leu Ile His Gly Phe Tyr Leu Val Gly Asp Leu Asn Ala  
435 440 445  
gct cta gac ctt tta caa gag atg atc tct agt ggt ttg tgc cct gat  
Ala Leu Asp Leu Leu Gln Glu Met Ile Ser Ser Gly Leu Cys Pro Asp  
450 455 460  
atc gtt act tgt gac act ttg ctg gat ggt ctc tgc gat aat ggg aaa 1440  
Ile Val Thr Cys Asp Thr Leu Leu Asp Gly Leu Cys Asp Asn Gly Lys  
465 470 475 480  
cta aaa gat gca ttg gaa atg ttt aag gtt atg cag aag agt aag aag  
Leu Lys Asp Ala Leu Glu Met Phe Lys Val Met Gln Lys Ser Lys Lys  
485 490 495  
gat ctt gat gct agt cac ccc ttc aat ggt gtg gaa cct gat gtt caa  
Asp Leu Asp Ala Ser His Pro Phe Asn Gly Val Glu Pro Asp Val Gln  
500 505 510  
act tac aat ata ttg atc agc ggc ttg atc aat gaa ggg aag ttt tta  
Thr Tyr Asn Ile Leu Ile Ser Gly Leu Ile Asn Glu Gly Lys Phe Leu  
515 520 525  
gag gcc gag gaa tta tac gag gag atg ccc cac agg ggt ata gtc cca  
Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Glu Glu Met Pro His Arg Gly Ile Val Pro  
530 535 540  
gat act atc acc tat agc tca atg atc gat gga tta tgc aag cag agc 1680  
Asp Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp Gly Leu Cys Lys Gln Ser  
545 550 555 560

cgc cta gat gag gct aca caa atg ttt gat tcg atg ggt agc aag agc  
Arg Leu Asp Glu Ala Thr Gln Met Phe Asp Ser Met Gly Ser Lys Ser

565

570

575

ttc tct cca aac gta gtg acc ttt act aca ctc att aat ggc tac tgt

Phe Ser Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Ile Asn Gly Tyr Cys

580

585

590

aag gca gga agg gtt gat gat ggg ctg gag ctt ttc tgc gag atg ggt

Lys Ala Gly Arg Val Asp Asp Gly Leu Glu Leu Phe Cys Glu Met Gly

595

600

605

cga aga ggg ata gtt gct aac gca att act tac atc act ttg att tgt

Arg Arg Gly Ile Val Ala Asn Ala Ile Thr Tyr Ile Thr Leu Ile Cys

610

615

620

ggt ttt cgt aaa gtg ggt aat att aat ggg gct cta gac att ttc cag 1920

Gly Phe Arg Lys Val Gly Asn Ile Asn Gly Ala Leu Asp Ile Phe Gln

625

630

635

640

gag atg att tca agt ggt gtg tat cct gat acc att acc atc cgc aat 1968

Glu Met Ile Ser Ser Gly Val Tyr Pro Asp Thr Ile Thr Ile Arg Asn

645

650

655

atg ctg act ggt tta tgg agt aaa gag gaa cta aaa agg gca gtg gca 2016

Met Leu Thr Gly Leu Trp Ser Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Val Ala

660

665

670

atg ctt gag aaa ctg cag atg agt atg gat cta tca ttt ggg gga tga 2064

Met Leu Glu Lys Leu Gln Met Ser Met Asp Leu Ser Phe Gly Gly

675

680

685

【 0 1 7 6 】

<210> 3

<211> 687

<212> PRT

<213> Raphanus sativus

&lt;400&gt; 3

Met Leu Ala Arg Val Cys Gly Phe Lys Cys Ser Ser Ser Pro Ala Glu  
1 5 10 15  
Ser Ala Ala Arg Leu Phe Cys Thr Arg Ser Ile Arg Asp Thr Leu Ala  
20 25 30  
Lys Ala Ser Gly Glu Ser Cys Glu Ala Gly Phe Gly Gly Glu Ser Leu  
35 40 45  
Lys Leu Gln Ser Gly Phe His Glu Ile Lys Gly Leu Glu Asp Ala Ile  
50 55 60  
Asp Leu Phe Ser Asp Met Leu Arg Ser Arg Pro Leu Pro Ser Val Val  
65 70 75 80  
Asp Phe Cys Lys Leu Met Gly Val Val Val Arg Met Glu Arg Pro Asp  
85 90 95  
Leu Val Ile Ser Leu Tyr Gln Lys Met Glu Arg Lys Gln Ile Arg Cys  
100 105 110  
Asp Ile Tyr Ser Phe Asn Ile Leu Ile Lys Cys Phe Cys Ser Cys Ser  
115 120 125  
Lys Leu Pro Phe Ala Leu Ser Thr Phe Gly Lys Ile Thr Lys Leu Gly  
130 135 140  
Leu His Pro Asp Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Leu His Gly Leu Cys  
145 150 155 160  
Val Glu Asp Arg Val Ser Glu Ala Leu Asp Phe Phe His Gln Met Phe  
165 170 175  
Glu Thr Thr Cys Arg Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Met Asn  
180 185 190  
Gly Leu Cys Arg Glu Gly Arg Ile Val Glu Ala Val Ala Leu Leu Asp  
195 200 205  
Arg Met Met Glu Asp Gly Leu Gln Pro Thr Gln Ile Thr Tyr Gly Thr  
210 215 220

Ile Val Asp Gly Met Cys Lys Lys Gly Asp Thr Val Ser Ala Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Leu Leu Arg Lys Met Glu Glu Val Ser His Ile Ile Pro Asn Val Val  
 245 250 255  
 Ile Tyr Ser Ala Ile Ile Asp Ser Leu Cys Lys Asp Gly Arg His Ser  
 260 265 270  
 Asp Ala Gln Asn Leu Phe Thr Glu Met Gln Glu Lys Gly Ile Phe Pro  
 275 280 285  
 Asp Leu Phe Thr Tyr Asn Ser Met Ile Val Gly Phe Cys Ser Ser Gly  
 290 295 300  
 Arg Trp Ser Asp Ala Glu Gln Leu Leu Gln Glu Met Leu Glu Arg Lys  
 305 310 315 320  
 Ile Ser Pro Asp Val Val Thr Tyr Asn Ala Leu Ile Asn Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Lys Glu Gly Lys Phe Phe Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Asp Glu Met Leu  
 340 345 350  
 Pro Arg Gly Ile Ile Pro Asn Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp  
 355 360 365  
 Gly Phe Cys Lys Gln Asn Arg Leu Asp Ala Ala Glu His Met Phe Tyr  
 370 375 380  
 Leu Met Ala Thr Lys Gly Cys Ser Pro Asn Leu Ile Thr Phe Asn Thr  
 385 390 395 400  
 Leu Ile Asp Gly Tyr Cys Gly Ala Lys Arg Ile Asp Asp Gly Met Glu  
 405 410 415  
 Leu Leu His Glu Met Thr Glu Thr Gly Leu Val Ala Asp Thr Thr Thr  
 420 425 430  
 Tyr Asn Thr Leu Ile His Gly Phe Tyr Leu Val Gly Asp Leu Asn Ala  
 435 440 445  
 Ala Leu Asp Leu Leu Gln Glu Met Ile Ser Ser Gly Leu Cys Pro Asp



450	455	460
Ile Val Thr Cys Asp Thr Leu Leu Asp Gly Leu Cys Asp Asn Gly Lys		
465	470	475
Leu Lys Asp Ala Leu Glu Met Phe Lys Val Met Gln Lys Ser Lys Lys		480
	485	490
Asp Leu Asp Ala Ser His Pro Phe Asn Gly Val Glu Pro Asp Val Gln		495
500	505	510
Thr Tyr Asn Ile Leu Ile Ser Gly Leu Ile Asn Glu Gly Lys Phe Leu		
515	520	525
Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Glu Glu Met Pro His Arg Gly Ile Val Pro		
530	535	540
Asp Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp Gly Leu Cys Lys Gln Ser		
545	550	555
Arg Leu Asp Glu Ala Thr Gln Met Phe Asp Ser Met Gly Ser Lys Ser		560
565	570	575
Phe Ser Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Ile Asn Gly Tyr Cys		
580	585	590
Lys Ala Gly Arg Val Asp Asp Gly Leu Glu Leu Phe Cys Glu Met Gly		
595	600	605
Arg Arg Gly Ile Val Ala Asn Ala Ile Thr Tyr Ile Thr Leu Ile Cys		
610	615	620
Gly Phe Arg Lys Val Gly Asn Ile Asn Gly Ala Leu Asp Ile Phe Gln		
625	630	635
Glu Met Ile Ser Ser Gly Val Tyr Pro Asp Thr Ile Thr Ile Arg Asn		640
645	650	655
Met Leu Thr Gly Leu Trp Ser Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Val Ala		
660	665	670
Met Leu Glu Lys Leu Gln Met Ser Met Asp Leu Ser Phe Gly Gly		
675	680	685

## 【0177】

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 4

gaagcaaaaa agaaaacgag cagag 25

## 【0178】

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 5

ccaaaaatcc gaaatccgaa tagac 25

## 【0179】

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 6

ctcggctctg ggtttagtga 20

## 【0180】

&lt;210&gt; 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

tccacaaacc ctagccaaca

20

【 0 1 8 1 】

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

gcttatgctt ctctggttcg cctc

24

【 0 1 8 2 】

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

ctcagttttc gtcaccttac acaatgc

27

【 0 1 8 3 】

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

gattcctttc tcttgcatTT cag

23

【0184】

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11

atctcgtcct ttaccttctg tgg

23

【0185】

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

cgggatccgc tcacaatt

18

【0186】

<210> 13

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13

gcggatccca atttcattct gcatcactct ccctgtcggt atcgacctcg caaggttttt 60

gaaacggccg aaacgggaag tgacaatacc gcttttcttc 100

【018.7】

<210> 14

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

ggaattcact aactttacat tcagtaggag tgagattatg acaaaaagtg gacaattttt 60

cgaaaaaggt aatcatgcat ttatatgctg aagaaaagcg 100

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、Rfマーカー遺伝地図を示す。

【図2】

図2は、配列番号1に記載の塩基配列を十分に保持するラムダクロンCHIの構造の模式図を示す。

【図3】

図3は、形質転換体中の導入DNAをPCR法を用いて検出した結果を示す。

【図4】

図4は、形質転換体中におけるCMSタンパクであるORF125の蓄積量の減少をウェスタンブロッティング法により解析した結果を示す。

【図5】

図5は、形質転換ナタネの開花体から薬を取り出し、顕微鏡観察した結果を示す。

【図6】



図 6 は、pSTV125-5' #LA6 と pSTV125-5' #LA12 の塩基配列を示す。

【書類名】

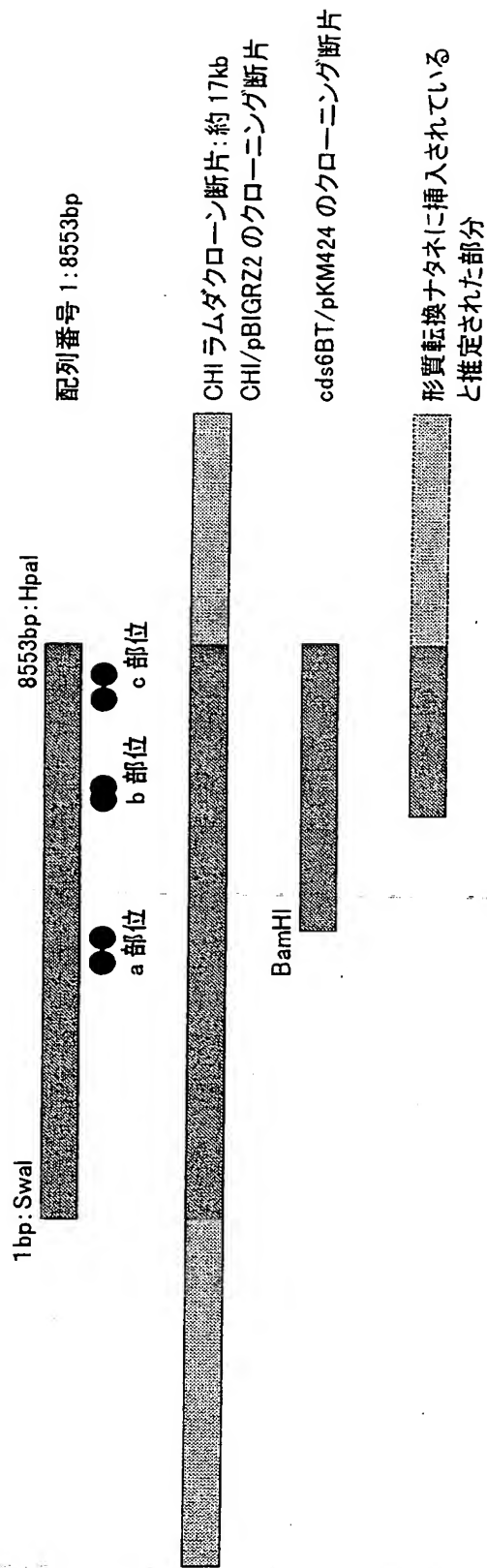
図面

【図 1】

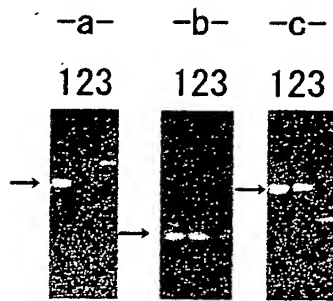




【図 2】



【図 3】



lane 1 コントロールベクター

lane 2 形質転換ナタネ

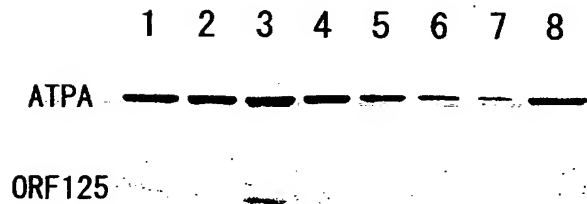
lane 3 細胞質雄性不稔ナタネ

a: 3186bp-3753bp length:568bp

b: 4869bp-5112bp length:244bp

c: 7766bp-8250bp length:485bp

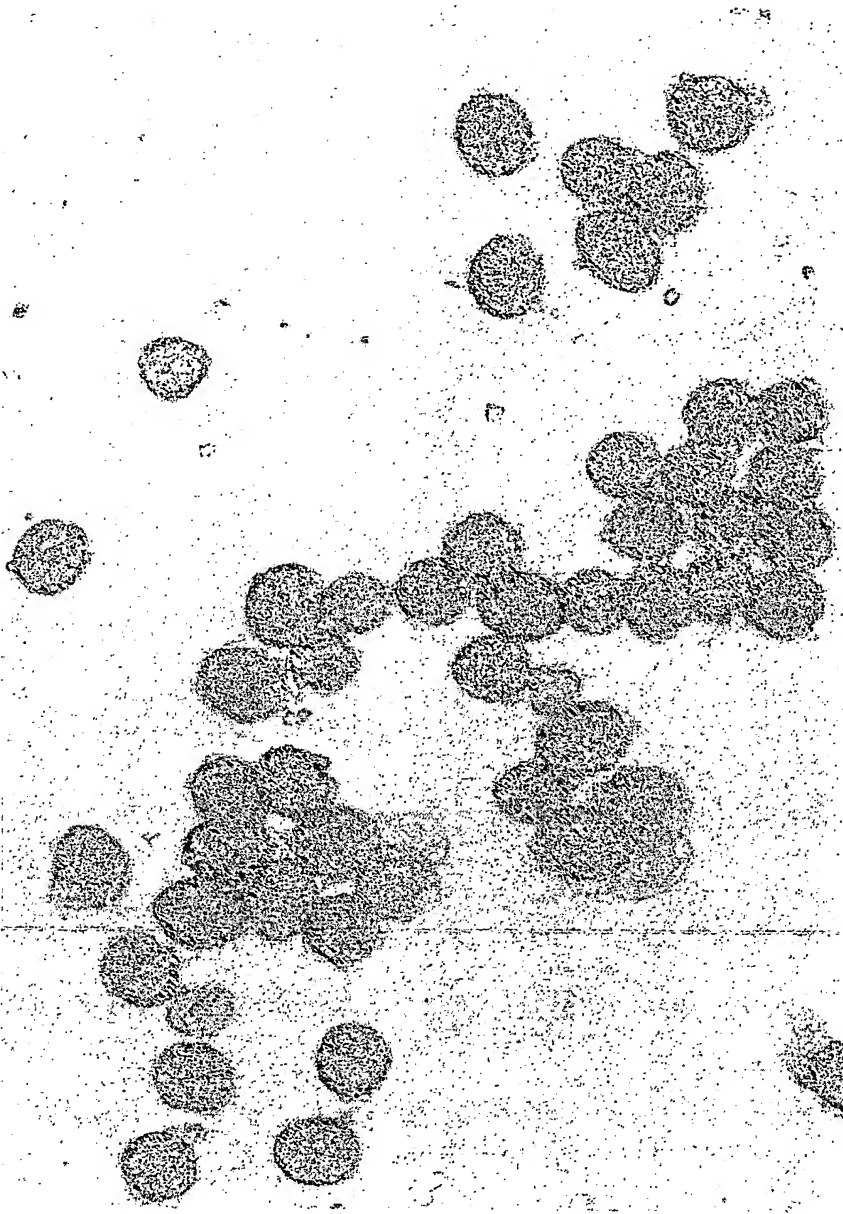
【図 4】

lane 1 細胞質雄性不稔ナタネ -1- 15 $\mu$ glane 2 稔性回復ナタネ 15 $\mu$ glane 3 細胞質雄性不稔ナタネ -2- 15 $\mu$ g

lane 4 ~ 7 細胞質雄性不稔ナタネ -2-

15/2 $\mu$ g, 15/4 $\mu$ g, 15/8 $\mu$ g, 15/16 $\mu$ g 希釈系列lane 8 形質転換ナタネ 15 $\mu$ g

【図5】



## 【図 6】

```
pSTV125-5' #LA12.nuc 1:GGATCCCAATTCATTCTGCATCACTCTCCCTGTCGTTATGCGACCTCGCAAGGTTTTTG 60
pSTV125-5' #LA6.nuc 1:GGATCCCAATTCATTCTGCATCACTCTCCCTGTCGTTATGCGACCTCG-CAAGGTTTTTG 59
***** * *****

pSTV125-5' #LA12.nuc 61:AAACGGCCGAAACGGGAAGTGACAATACCGCTTTTCTTGAGCATATAAATCATGATTAC- 119
pSTV125-5' #LA6.nuc 60:AAACGGCCGAAACGGGAAGTGACAATACCGCTTTTCTTCAGCATATAAATGCATGATTAC 119
***** * *****

pSTV125-5' #LA12.nuc 120:CTTTTTCGAAAAATTGTCCACTTTTTGTCATAATCCTCACTTCCTACTGAATGTAAAGT 179
pSTV125-5' #LA6.nuc 120:CTTTT-TCGAAAAATTGTCCACTTTTTGTCATAATCTCACTCCTACTGAAATTAA-A-GT 176
***** * * *

pSTV125-5' #LA12.nuc 180:TAGTGAATTC 189
pSTV125-5' #LA6.nuc 177:TAGTGAATTC 186
*****
```

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 R f 遺伝子、特には、ダイコン由来の R f 1 遺伝子を単離してその構造を同定すること。

【解決手段】 Pentatricopeptide Repeat (以下PPRと略) モチーフを14個以上持ち、該PPRモチーフ群は3つ以上のブロックに分割されており、該各ブロックはそれぞれ少なくとも2つ以上のPPRモチーフを有し、かつ、カルボキシ末端(C末端)側のブロックは4つのPPRモチーフを有することを特徴とする細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

【選択図】 なし

特願 2002-020083

出願人履歴情報

識別番号

[000005968]

1. 変更年月日

1994年10月20日

[変更理由]

名称変更

住所

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

氏名

三菱化学株式会社